

Estudi dels tioèters urinaris. Noves aplicacions

Amàlia Lafuente i Fló

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

ESTUDI DELS TIOÈTERS URINARIS
NOVES APLICACIONS

Tesi Doctoral presentada per
Amàlia Lafuente i Fló
Reus, abril, 1986



CATEDRA DE FARMACOLOGIA Y TERAPÉUTICA
FACULTAD DE MEDICINA DE REUS UNIVERSIDAD DE BARCELONA

C/ San Lorenzo, 21 - REUS (T. 977.21.11.11)

En JORDI MALLOL MIRON, Catedràtic de Farmacologia de la Facultat de Medicina, extensió de Reus, de la Universitat de Barcelona,

CERTIFICA : Que la Tesi Doctoral " Estudi dels tioèters urinaris. Noves aplicacions ", presentada per na Amàlia Lafuente i Fló, ha sigut realitzada sota la nostra direcció i reuneix els requisits necessaris per la seva presentació i posterior defensa davant del Tribunal corresponent.

Reus, 11 d'Abril de 1986

Signat Prof. J. Mallol Mirón



CATEDRA DE FARMACOLOGIA Y TERAPEUTICA
FACULTAD DE MEDICINA DE REUS - UNIVERSIDAD DE BARCELONA

C. San Llorenç 12 - REUS (TARAGONA) - 43100 - SPAIN

exe

sistents:

Mallol

Mallol

Lafuente

A la reunió celebrada el dia 4 d'Abril de 1986, els membres del Departament de Farmacologia (en constitució), que es relacionen al marge van examinar el projecte de Tesi Doctoral presentat per:

Na AMALIA LAFUENTE I FLO

sobre el tema:

ESTUDI DELS TIOETERS URINARIS. NOVES APLICACIONS.

Aquest projecte ha estat realitzat en la seva totalitat a la càtedra de Farmacologia, dirigit pel Prof. Jordi Mallol i Mirón.

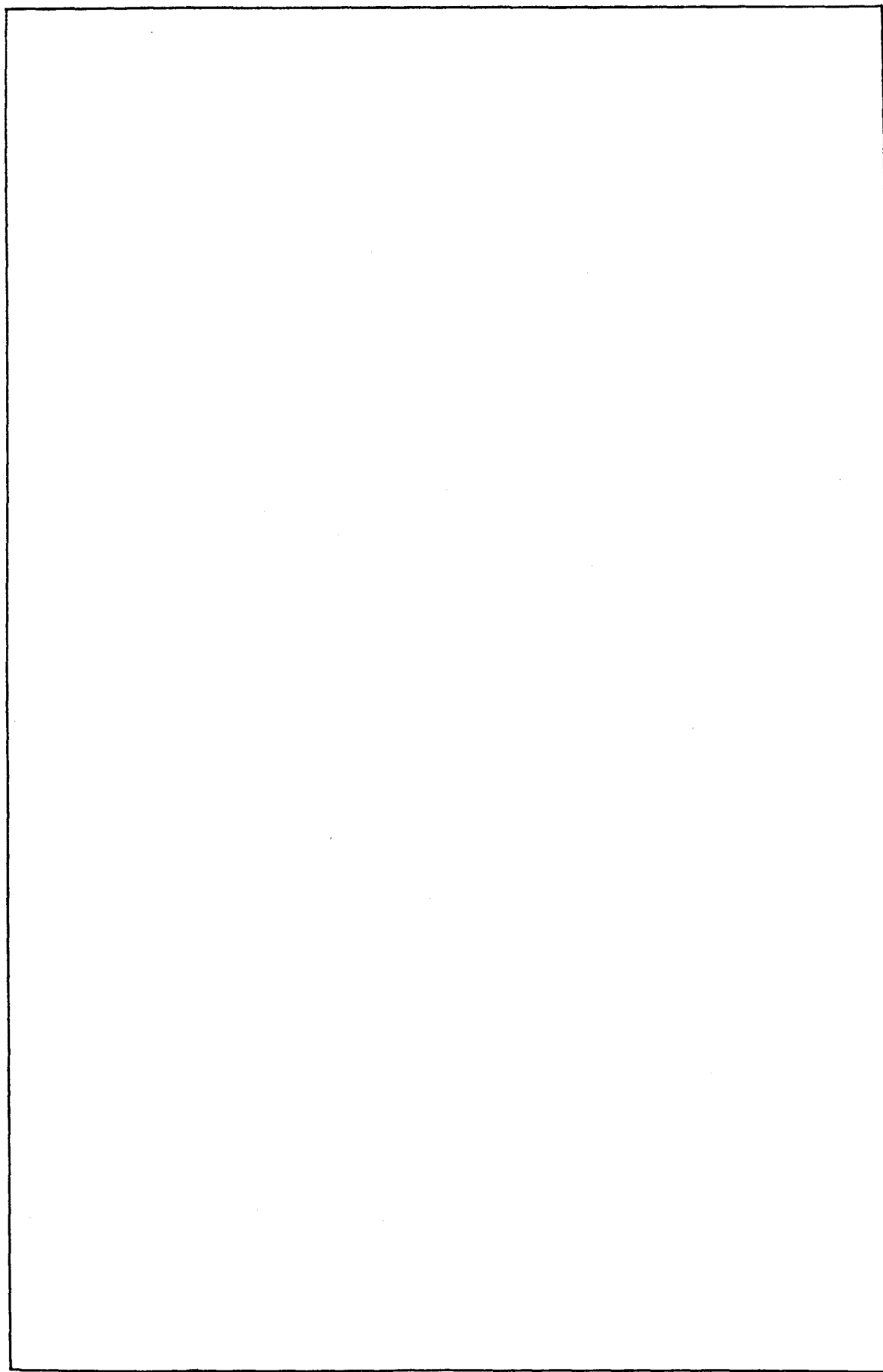
Veient el treball realitzat per l'aspirant al Títol de Doctor i una vegada examinat el projecte presentat, aquest Departament considera adequada la seva presentació i defensa davant del Tribunal corresponent, i perquè en prengueu coneixement i tingui els efectes oportuns, certifico que aquest acord va ésser pres a la reunió abans esmentada.

Reus a 4 d'Abril de 1986

El catedràtic:

Signat Jordi Mallol i Mirón

Al meu marit, pel seu estímul
i també per la seva paciència



AGRAIMENTS

Pocs assoliments humans en la investigació són el resultat del treball d'un sol individu sinó de la tasca coordinada de tot un equip de persones. Per a poder portar a terme aquesta tesi doctoral s'ha comptat amb valuoses col.laboracions que d'una forma o altra han fet possible la seva realització.

Per tot això vull expressar la meva gratitud:

Al Professor Jordi Mallol i Mirón, Catedràtic de Farmacologia de la Universitat de Barcelona, mestre i guia de la meva formació investigadora i universitària, que amb l'exemple de la seva dedicació a l'estudi i a la recerca és un estímul constant per a tots els que treballen al seu costat. Ell m'ha introduït en la temàtica que ha conduït aquest estudi, orientant-me i aconsellant-me en tot moment.

A Jordi Jara i Llussà que ha seguit dia a dia l'evolució d'aquesta tesi aportant els seus coneixements tècnics i la seva completa dedicació.

A Montserrat Giralt i Batista, per les moltes hores dedicades a la curiosa realització de les experiències.

Al Dr. Jose Paternain Suberviola per la seva ajuda i consells en els moments difícils.

Al Dr. Joan Bosch i Sabater per la seva generosa col.laboració en la determinació de les creatinines urinàries,

així com al seu col.laborador Josep M^a Simó i Sisó.

A Teresa Gomis de Barberà i Albert Cobos i Carbó,
per la dedicació que han posat en el precís estudi es-
tadístic dels resultats.

A M^a José Figueres i Salvat, Josep Cano i Lira i
Carles Alier i Laplana, per la seva assistència tècni-
ca en la utilització de l'ordinador.

A Carme Agustench i Gené per la seva contribució en
la tasca mecanogràfica.

Finalment, a tots aquells que s'han prestat voluntà-
riament a participar en les experiències, sense la
col.laboració dels quals, aquesta tesi no s'hauria po-
gut portar a terme.

A tots ells, el meu agraïment.

INDEX

	Pàg.
INTRODUCCIÓ	17
1.- SUMARI	18
2.- JUSTIFICACIÓ D'AQUESTA TESI EN L'ÀREA DE FARMACOLOGIA	21
2.1.- IMPORTÀNCIA DE LA PARTICIPACIÓ DEL FARMACÒLEG EN ELS PLANS DE SALUT PÚBLICA	21
3.- ECOLOGIA, MEDI AMBIENT I CONTAMINACIÓ AMBIENTAL	23
3.1.- REPERCUSSIONS DEL MEDI AMBIENT SOBRE LA SALUT	24
3.1.1.- <u>REPERCUSSIONS POSITIVES</u>	26
3.1.2.- <u>REPERCUSSIONS NEGATIVES</u>	26
3.2.- CONTAMINACIÓ AMBIENTAL	28
3.2.1.- <u>CONTAMINACIÓ AMBIENTAL D'ESPAIS OBERTS O EXTERIOR</u>	28
3.2.2.- <u>CONTAMINACIÓ AMBIENTAL D'ESPAIS TANCATS O INTERIOR</u>	33

	Pàg.
3.2.3.- <u>LA CONTAMINACIÓ EXTERNA</u>	34
3.2.4.- <u>LA CONTAMINACIÓ INTERNA</u>	34
3.3.- AGENTS CONTAMINANTS	37
3.3.1.- <u>FÍSICS</u>	37
3.3.2.- <u>QUÍMICS</u>	37
3.3.2.1.- <u>Agents electrofíllics</u>	39
3.3.2.2.- <u>Presència d'aquests agents</u> <u>en el Medi Ambient</u>	40
4.- MECANISMES DE DEFENSA DEL NOSTRE ORGANISME DAVANT DELS AGENTS ELECTROFÍLICS	45
4.1.- METABOLITZACIÓ I PRINCIPALS VIES METABÒLIQUES	45
4.2.- LA METABOLITZACIÓ DELS AGENTS ELECTROFÍLICS	46
4.2.1.- <u>PROCESSOS QUE PODEN DONAR-SE</u> <u>PRÈVIAMENT A LA CONJUGACIÓ</u> <u>AMB EL GLUTATION</u>	47

	Pàg.
4.2.2.- <u>CONJUGACIÓ DELS AGENTS</u> <u>ELECTROFÍLICS AMB EL</u> <u>GLUTATION</u>	49
4.3.- LES GLUTATION S-TRANSFERASAS	52
4.3.1.- <u>NATURALESA</u>	52
4.3.2.- <u>FORMA D'ACCIO</u>	55
4.3.3.- <u>LOCALITZACIÓ INTRACEL.LULAR</u>	56
4.3.4.- <u>DISTRIBUCIÓ PELS TEIXITS</u>	57
4.3.5.- <u>DISTRIBUCIÓ PER ESPÈCIES</u>	59
4.3.6.- <u>ONTOGÈNESI</u>	59
4.3.7.- <u>INDUCCIÓ</u>	61
4.3.8.- <u>INHIBICIÓ</u>	63
4.3.9.- <u>DIFERÈNCIES SEGONS EL SEXE</u>	64
4.3.10.- <u>SUBSTRATS</u>	64
4.4.- RESUM	67

Pàg.

5.- ELS TIOÈTERS URINARIS COM A INDICADOR BIOLÒGIC DE CONTAMINACIÓ INTERNA	72
5.1.- ELS TIOÈTERS URINARIS COM A INDICADOR DE L'EXPOSICIÓ A COMPOSTOS ELECTROFÍLICS	75
5.2.- ELS TIOÈTERS URINARIS COM A INDICADOR DE LA DETOXIFICACIÓ DELS COMPOSTOS ELECTROFÍLICS	79

	Pàg.
HIPÒTESI DE TREBALL	82
1.- HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS . . .	83
1.1.- OBJECTIUS QUANT A L'EXPOSICIÓ A LA CONTAMINACIÓ AMBIENTAL	85
1.2.- OBJECTIUS QUANT A L'EXPOSICIÓ LABORAL AL PER	87
1.3.- OBJECTIUS QUANT A L'EXPOSICIÓ LABORAL A L'ASFALT	89
1.4.- OBJECTIUS QUANT A L'EXPOSICIÓ AL FUM DEL TABAC	91

	Pàg.
MATERIAL I MÈTODES	93
1.- GRUPS DE MOSTRES ESTUDIADAES	94
1.1.- ESTUDI SOBRE L'EXPOSICIÓ A LA CONTAMINACIÓ AMBIENTAL	94
1.1.1.- <u>DISSENY EXPERIMENTAL</u>	94
1.1.2.- <u>OBTENCIÓ DE LES MOSTRES</u> <u>D'ORINA</u>	96
1.2.- ESTUDI SOBRE L'EXPOSICIÓ AL PERCLORETILE (PER)	96
1.2.1.- <u>ESTUDI REALITZAT EN ELS</u> <u>TREBALLADORS D'ESTABLIMENTS</u> <u>DE NETEJA EN SEC</u>	96
1.2.1.1.- <u>Mostratge inicial</u>	98
1.2.1.2.- <u>Estudi individualitzat</u> <u>a llarg termini</u>	98
1.2.2.- <u>ESTUDI REALITZAT EN ELS</u> <u>TREBALLADORS D'UNA PLANTA</u> <u>PRODUCTORA DE PER</u>	100
1.2.3.- <u>ESTUDI DEL METABOLISME DEL</u> <u>PER EN FETGE DE RATA I RATOLÍ</u>	102

	Pàg.
1.2.3.1.- <u>Efectes enzimàtics del PER</u> <u>després de la seva adminis-</u> <u>tració "in vivo" al ratolí.</u> . . .	102
1.2.3.2.- <u>Efectes enzimàtics del PER</u> <u>"in vitro" sobre fracció</u> <u>soluble de fetge de rata</u> . . .	102
1.3.- ESTUDI SOBRE L'EXPOSICIÓ LABORAL ALS ASFALTS	104
1.3.1.- <u>MOSTRATGE INICIAL</u>	104
1.3.2.- <u>ESTUDI INDIVIDUALITZAT A</u> <u>LLARG TERMINI</u>	104
1.4.- ESTUDI SOBRE L'EXPOSICIÓ AL FUM DEL TABAC	106
1.4.1.- <u>ESTUDI GENERAL D'INDIVIDUS</u> <u>FUMADORS I NO FUMADORS</u>	106
1.4.2.- <u>ESTUDI INDIVIDUALITZAT DE LA</u> <u>PROGRESSIÓ CONTROLADA DE</u> <u>DE L'HÀBIT TABÀQUIC</u>	108
1.4.3.- <u>ESTUDI COMPARATIU ENTRE</u> <u>FUMADORS DE TABAC "NORMAL"</u> <u>I "BAIX" EN QUITRÀ</u>	108

	Pàg.
2.- MÈTODES EMPRATS	112
2.1.- DETERMINACIÓ DE TIOÈTERS URINARIS	
URINARIS	112
2.1.1.- <u>CONSERVACIÓ DE LES MOSTRES</u>	
<u>D'ORINA</u>	112
2.1.2.- <u>DETERMINACIÓ DE LA CREATININA</u>	
URINÀRIA	112
2.1.3.- <u>DESCRIPCIÓ DE L'ANÀLISI DELS</u>	
<u>TIOÈTERS URINARIS</u>	113
2.1.3.1.- <u>Tècnica detallada</u>	113
2.1.3.2.- <u>Elaboració de la recta patró.</u>	117
2.1.3.3.- <u>Utillatge necessari</u>	119
2.2.- DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT	
ENZIMÀTICA DE LA GLUTATION	
S-TRANSFERASA EN FETGE	
DE RATA I RATOLÍ	120
2.2.1.- <u>PREPARACIÓ DE LA FRACCIÓ</u>	
<u>ENZIMÀTICA</u>	120
2.2.2.- <u>UTILITZANT L'ALCOHOL ALÍLIC</u>	
<u>COM A SUBSTRAT</u>	121
2.2.3.- <u>UTILITZANT EL CLORUR DE</u>	
<u>p-NITROBENZIL COM A SUBSTRAT.</u>	122

	Pàg.
2.2.4.- <u>ESTUDI DE LA INFLUÈNCIA DEL</u> <u>PER SOBRE L'ACTIVITAT DE</u> <u>DE LA GST HEPÀTICA</u>	123
2.2.5.- <u>DETERMINACIÓ DE LES PROTEINES</u> <u>PEL MÈTODE DE LOWRY</u>	125
2.2.6.- <u>UTILLATGE PRECIS</u>	126
2.3.- <u>ANÀLISIS ESTADÍSTIQUES EMPRADES</u> . .	127
2.3.1.- <u>ANÀLISI DE LA VARIÀNCIA</u>	127
2.3.2.- <u>ANÀLISI DE LA VARIÀNCIA DE</u> <u>PLANS FACTORIALS</u>	128
2.3.3.- <u>PROVA DE SCHEFFÉ</u>	128

	Pàg.
RESULTATS	129
1.- ESTUDI SOBRE L'EXPOSICIÓ A LA CONTAMINACIÓ ATMOSFÈRICA	130
2.- ESTUDI SOBRE L'EXPOSICIÓ AL PER . . .	133
2.1.- ESTUDI REALITZAT EN ELS TREBALLADORS D'ESTABLIMENTS DE NETEJA EN SEC	133
2.1.1.- <u>MOSTRATGE INICIAL</u>	133
2.1.2.- <u>ESTUDI INDIVIDUALITZAT</u> <u>A LLARG TERMINI</u>	133
2.2.- ESTUDI REALITZAT EN ELS TREBALLADORS D'UNA PLANTA PRODUCTORA DE PER	137
2.3.- ESTUDI DEL METABOLISME DEL PER EN FETGE DE RATA I RATOLÍ	141
2.3.1.- <u>CARACTERITZACIÓ DE L'ENZIM</u> . . .	141
2.3.2.- <u>EFACTES DEL PER SOBRE</u> <u>L'ACTIVITAT GST DESPRÉS</u> <u>DE LA SEVA ADMINISTRACIÓ</u> <u>"IN VIVO" AL RATOLÍ</u>	146

	Pàg.
2.3.3.- <u>EFFECTES ENZIMÀTICS DEL PER</u> <u>"IN VITRO" SOBRE FETGE</u> <u>DE RATA</u>	146
3.- ESTUDI SOBRE L'EXPOSICIÓ LABORAL ALS ASFALTS	152
3.1.- MOSTRATGE INICIAL	152
3.2.- ESTUDI INDIVIDUALITZAT A LLARG TERMINI	152
4.- ESTUDI SOBRE L'EXPOSICIÓ AL FUM DEL TACAB	156
4.1.- ESTUDI GENERAL D'INDIVIDUS FUMADORS I NO FUMADORS	156
4.2.- ESTUDI INDIVIDUALITZAT EN LA PROGRESSIÓ CONTROLADA DE L'HÀBIT TABÀQUIC	156
4.3.- ESTUDI COMPARATIU ENTRE FUMADORS DE TABAC "NORMAL" I "BAIX" EN QUITRÀ	159

	Pàg.
DISCUSSIÓ	162
1.- UTILITAT DE LA DETERMINACIÓ DE TIOÈTERS URINARIS COM A INDICADOR BIOLÒGIC	163
2.- DISCUSIÓ DE LA METODOLOGIA	169
2.1.- QUANT A LA DETERMINACIÓ DELS TU	169
2.2.- QUANT A LA DETERMINACIÓ DE LA CREATININA URINÀRIA	171
2.3.- QUANT A LA RECOLLIDA DE LES MOSTRES D'ORINA	172
2.4.- QUANT AL DISSENY EXPERIMENTAL	173
3.- DISCUSIÓ DELS RESULTATS	174
3.1.- SOBRE L'EXPOSICIÓ A LA CONTAMINACIÓ AMBIENTAL	174
3.2.- SOBRE L'EXPOSICIÓ AL PERCLORETILÈ	177

	Pàg.
3.2.1.- <u>ESTUDI SOBRE L'EXPOSICIÓ</u> <u>LABORAL AL PER</u>	177
3.2.2.- <u>ESTUDI SOBRE EL METABOLISME</u> <u>DEL PER EN FETGE DE RATA</u> <u>I RATOLÍ</u>	182
3.3.- <u>SOBRE L'EXPOSICIÓ LABORAL</u> <u>ALS ASFALTS</u>	187
3.4.- <u>SOBRE L'EXPOSICIÓ AL FUM DEL</u> <u>TABAC</u>	188
CONCLUSIONS	193
BIBLIOGRAFIA	197

INTRODUCCIO

INTRODUCCIÓ

1.- SUMARI

No sabem quin nom serà emprat en la posteritat per a caracteritzar la nostra era però amb tota seguretat se la podria nomenar l'Era química, tal és el nombre de molècules sintetitzades per l'home que impregnen l'ambient que ens envolta en la nostra vida diària. Per això el nostre concepte de civilització moderna és inconcebible sense un entorn químic superimpost a l'entorn natural.

Si la vida humana és millor gràcies a les nostres creacions químiques, o bé serà destruïda per elles, avui més que mai és una qüestió sense resposta . (E. Pellegrino, 1976).

Amb aquestes declaracions de Pellegrino (137), es posa de relleu que el propi home és capaç de provocar, a vegades inconscientment, canvis importants en el Medi Ambient, que alteren les repercussions que podriem considerar "naturals" i els beneficis perseguits es converteixen moltes vegades en perjudicis.

Entre ells, la nomenada CONTAMINACIÓ AMBIENTAL és la causa de trastorns sobre la nostra salut i origen de noves malalties.

En aquesta Tesi s'estudien els efectes sobre l'organisme humà d'alguns d'aquests agents contaminants, els nomenats electrofílics, que es troben abundantment repartits a l'atmosfera de les àrees industrials i urbanes, en molts ambients laborals, i sobre tot al fum del tabac.

Aquests compostos electrofílics són capaços, una vegada ingressats al nostre organisme, de formar enllaços covalents amb les cèl.lules i provocar en elles lesions irreversibles com a mutagènesi i carcinogènesi. ()

Per agreujar més la situació l'home disposa de sistemes enzimàtics capaços d'augmentar la toxicitat d'alguna d'aquestes substàncies, o inclús de convertir en tòxiques algunes que d'antuvi no ho eren (31,122,123,125).

Sortosament el nostre organisme compta amb diferents mètodes de defensa contra aquestes agressions, entre els que s'hi troben els sistemes de metabolització que permeten eliminar aquestes substàncies el més ràpidament possible. Els compostos electrofílics segueixen majoritàriament la via metabòlica de la conjugació amb el glutathion (GSH), mitjançant l'acció de les Glutathion S-Transferasa (GST), la qual cosa priva la toxicitat d'aquests agents i facilita la seva excreció.

Així doncs, aquest sistema Glutathion-Glutathion S-Transferasa, té un paper clarament detoxificador i protector davant d'aquests compostos.

El producte final d'aquesta conjugació és un tioèter inactiu, que s'elimina fàcilment per l'orina.

Els tioèters seran, per tant, un reflex del grau d'exposició de l'organisme als compostos electrofílics però, a més, ens permetran diferenciar, a igualtat d'exposició, la millor o pitjor capacitat de detoxificació de cada individu.

De tot això es dedueix que, per a valorar la importància d'un contaminant, no és suficient quantificar la seva concentració ambiental, que és el que podriem nomenar grau de CONTAMINACIÓ EXTERNA, sinó que s'han de tenir en compte també les interaccions amb els sistemes biològics (metabolització) que poden modificar el compost inicial. D'aquestes interaccions s'obté el que coneixem com a grau de CONTAMINACIÓ INTERNA o REAL, que serà molt variable per a cada individu, i no necessàriament coincidirà amb la CONTAMINACIÓ EXTERNA.

Es per tot això que adquireixen tant de valor els nomenats indicadors biològics, com a expressió molt fiable de la nomenada Exposició Interna.

Els tioèters urinaris han de considerar-se com a indicadors biològics i incluir-se en els plans de monitorització de Salut Pública, com de fet ja passa a d'altres països.

2.- JUSTIFICACIÓ D'AQUESTA TESI EN L'ÀREA FARMACOLÒGICA

2.1- IMPORTÀNCIA DE LA PARTICIPACIÓ DEL FARMACÒLEG EN ELS PLANS DE SALUT PÚBLICA

Els agents químics, farmacològics i farmacèutics s'han integrat tan intensament a l'experiència personal i social de l'home, que el seu ús serà racional i responsable si les funcions socials de tots els especialistes relacionats amb aquests agents químics en general, resten ben definides.

En primer lloc, caldrà una coordinació de les funcions de tots els professionals, com són: químics, fisiòlegs, farmacèutics, farmacòlegs, etc., sobrepassant inclús els límits de competències tradicionalment impostes. Existeixen diferents nivells d'actuació i distintes tasques per a tots, i només petits conflictes territorials i jurisdiccionals poden entorpir la bona coordinació d'aquests especialistes en el gran paper que els té reservat la Salut Pública.

El farmacòleg, a part de la funció clàssica de descobrir i desenvolupar nous productes, ha de tenir també un paper preponderant en el control d'agents químics emprats en la ramaderia, agricultura i indústria. Ha de dependre d'ells també l'ensenyar i portar a terme treballs d'investigació bàsica, que permetin després, establir sistemes de vigilància i informació, a fi de què la utilització dels agents químics sigui racional.

Per tant: Allà on existeixi un problema d'interacció d'agents químics amb la vida, la presència del farmacòleg es fa indispensable i adquireix una gran significació social . (E. Pellegrino, 1976).

3.- ECOLOGIA, MEDI AMBIENT I CONTAMINACIÓ AMBIENTAL

Quan definim ECOLOGIA com "la ciència que estudia les relacions entre els organismes vius i el seu medi ambient, i també les relacions d'aquests organismes en tre ells, dins del MEDI" ens adonem que el MEDI AMBIENT és quelcom tan consubstancial amb la vida, que aquésta no podria existir sense un medi AMBIENT, almenys tal i com entenem nosaltres el concepte d'organisme viu.

Quan parlem de MEDI, pensem en coses, elements o factors que ens envolten i que ens condicionen, que estan fora de l'individu. Així parlem normalment de MEDI AMBIENT EXTERN, que serà la unitat d'espai ocupada per una població i en una època determinada (temps i espai definits). Això suposa, doncs, una sèrie de circumstàncies externes que influiran positivament o negativament en la vida d'un organisme.

En canvi, el terme HÀBITAT es refereix únicament a les condicions físiques i químiques de la domiciliació dels organismes; per tant, l'HÀBITAT serà un aspecte particular del MEDI AMBIENT.

Si no especifiquem més el concepte de MEDI AMBIENT queda definit pel que nomenarem MEDI AMBIENT EXTERN. Però no hem d'oblidar que seran les condicions favorables o desfavorables d'aquest MEDI EXTERN les que condicionaran les funcions del nostre MEDI INTERN, i, per tant, l'estat òptim de SALUT.

Al concepte general d'ECOLOGIA pot afegir-s'hi el terme ECOLOGIA HUMANA, que serà la branca de la Biologia que estudia la interrelació de l'organisme humà amb la totalitat de components i factors animats i inanimats, que integren el MEDI AMBIENT (147). En aquest sentit hem de contemplar l'home com una part de la NATURALISA (ecosistema); però l'ambient de l'home no és solament natural sinó que està modificat fortament per ell mateix, quan desenvolupa una vida social i cultural, conceptes que sobrepassen l'estudi ecològic del mateix (168).

Malgrat tot, el concepte ecològic pot seguir sent vàlid ja que l'home pertany a un ecosistema inclòs dins de la biosfera i al que se li poden aplicar les lleis bàsiques de l'ECOLOGIA, com són la necessitat i existència d'un esforç constant, a vegades i inconscientment, per a adaptar-se a les variacions de l'AMBIENT, per la seva vinculació indisoluble amb ell. (52)

3.1.- REPERCUSSIONS DEL MEDI AMBIENT SOBRE LA SALUT

Des de que l'OMS va definir la SALUT com l'estat de complet benestar físic mental i social, són nombroses les derivacions i interpretacions que es fan d'aquest concepte. Per exemple, és possible que existeixi un cert grau d'alteració física d'un individu però que estigui perfectament assumida i superada, i per tant pot existir també un estat de SALUT COMPENSAT.

En aquest sentit, creiem que les pròpies agressions que la nostra societat crea sobre el MEDI AMBIENT, i que repercuteixen desfavorablement sobre el nostre benestar físic, poden ser més o menys compensades pel grau relatiu de benestar social que comporten. Aquesta contínua lluita per a obtenir el màxim de benestar social, crea contínuament alteracions de l'Ecosistema, i és això el que ha originat dos conceptes socials molt recents:

- la lluita per a conèixer i mantenir el MEDI AMBIENT en condicions òptimes,
- la creació del concepte de SALUT PÚBLICA: ciència o art d'aplicar els coneixements i les habilitats de la Medicina i Ciències afins en un esforç organitzat de la comunitat per a conservar i millorar la SALUT dels grups d'individus (176).

El MEDI AMBIENT té efectes positius i negatius sobre la salut de l'home, però la característica principal que interessa remarcar en aquests moments és que el propi home és capaç, a vegades inconscientment, de provocar canvis importants en el MEDI AMBIENT, que finalment alteren el tipus de repercussió positiva o negativa que podriem considerar natural (5).

3.1.1.- REPERCUSSIONS POSITIVES

Seran totes aquelles que afavoreixin l'estat de SALUT de l'home, tal com ho hem definit abans. En aquest sentit, l'home ha sapigut aprofitar el MEDI AMBIENT per a obtenir beneficis. Això s'ha traduït en una millor qualitat de vida en alguns sectors del planeta, en un allargament de l'esperança de vida, lluita eficaç contra certes plagues, control d'algunes energies naturals, aprofitament de recursos, etc.

Tot això ha permès l'home d'enriquir els seus continguts socials i culturals.

Es a dir, que el coneixement de les característiques i propietats del MEDI AMBIENT, ha fet que l'home sigui capaç de reproduir-les i inclús millorar-les a la seva conveniència, obtenint beneficis en una proporció a vegades molt superior als que obtindria si s'abandonés a la inèrcia pròpia del MEDI.

3.1.2.- REPERCUSSIONS NEGATIVES

Precisament per la gran i cada vegada més accelerada capacitat de l'home per a modificar el MEDI AMBIENT, a les repercussions negatives pròpies de medi natural, hem d'afegir les creades per la seva manipulació. És aquest tema el que més ens preocupa i sobre el que basem els nostres criteris d'estudi.

De les repercussions negatives del MEDI AMBIENT o Biològic, en aquests moments només voldriem remarcar els canvis ecològics profunds que poden generar-se a l'entorn i que repercuteixen sobre tot l'ecosistema. Aquests canvis són generalment deguts a processos adaptatius dels éssers vius a les noves condicions de l'entorn creades per l'home, com per exemple les mutacions que converteixen a determinats insectes resistents als insecticides. A vegades els trastorns del MEDI AMBIENT tenen una repercussió tan negativa sobre determinades espècies que determinen la seva extinció.

Tampoc profunditzarem aquí sobre les repercussions negatives que pot tenir el nomenat MEDI SUPERORGANIC, cultural o social, sobre l'individu, encara que és evident que poden afectar a la SALUT, sobre tot a la SALUT mental (142).

Sí insistirem específicament sobre les repercussions negatives que pot tenir el MEDI FÍSIC o inert. Quan s'introdueixen en aquest Medi modificacions importants o inesperades, augmenta la possibilitat d'incidències negatives sobre l'home (130,131). Això es dona sobre tot al nomenat MEDI Físic Secundari, que és el que ha creat l'home sobre el MEDI Físic Primari o natural, a base d'introduir noves tecnologies i manipulacions (conreus, vies de comunicació, canalitzacions d'aigua, ciutats, indústries, etc.). Els beneficis perseguits per l'home es converteixen en perjudicials (sequera, eliminació de la flora i fauna, etc.) (35,138). Però el més important és la nomenada CONTAMINACIÓ AMBIENTAL.

3.2.- CONTAMINACIÓ AMBIENTAL

L'OMS la defineix com "la presència a l'aire, aigua i sòl de factors o substàncies en quantitat i concentracions determinades i durant un temps determinat, que originen molèsties, amenacen la vida o la SALUT de les persones, animals o plantes".

Així doncs, la CONTAMINACIÓ AMBIENTAL, amb altres factors derivats de la forma de vida, alimentació, hàbits, etc., determinaran una important àrea de la patologia humana (8,169).

Parlant de CONTAMINACIÓ AMBIENTAL, haurem de distingir, per una banda:

- CONTAMINACIÓ D'ESPAIS OBERTS O EXTERIOR, que és la que generalment es coneix com a contaminació ambiental, i per l'altra
- CONTAMINACIÓ D'ESPAIS TANCATS O INTERIOR, que és la que es dóna dins dels recintes que l'home ha construït, per a complir diverses funcions: habitacles, treball, Serveis Públics, etc.

3.2.1.- CONTAMINACIÓ AMBIENTAL D'ESPAIS OBERTS O EXTERIOR

En la problemàtica de la Contaminació Ambiental existeixen dos aspectes estretament relacionats. Per una

banda el FOCUS D'EMISSIÓ de tipus industrial, domèstic o degut als mitjans de transport (Taula I) que projecten el contaminant primari a l'atmosfera. Per altra banda s'han de tenir en compte també els FACTORS MODIFICADORS (metereològics, reaccions químiques) que donen lloc a canvis en la concentració de contaminants a l'atmosfera o a la formació de CONTAMINANTS SECUNDARIS. Els darrers són el resultat de les interaccions químiques entre els contaminants primaris i els components normals de l'atmosfera. Per tant, les condicions de polució ambiental en un moment i lloc determinats seran el resultat de tots aquests factors (6,27,157) (Fig.1). La importància dels agents modificadors es manifesta pel fet que la problemàtica de la CONTAMINACIÓ AMBIENTAL no és un fenomen exclusiu de les grans concentracions urbanes o industrials. Les pluges àcides són un expressiu exemple del desplaçament de contaminants a grans distàncies degut a l'acció d'aquests agents.

Les variables meteorològiques que actuen, doncs, com a factors modificadors, tenen un paper de primer ordre en la determinació dels nivells de CONTAMINACIÓ ATMOSFÈRICA, junt amb les característiques geogràfiques de la zona (83). L'augment de la pressió baromètrica al costat d'una situació de calma donarà lloc a un increment de la concentració de polucionants i, per tant, d'efectes nocius de tipus respiratori. Contràriament, la conjunció de pressió baromètrica baixa i ràuxes de vent donarà lloc a una dispersió d'aquests polucionants per la qual cosa disminuirà la concentració ambiental de tipus primari i no s'afavorirà la formació de contaminants secundaris. La situació meteorològica més crítica és el fenomen d'inversió tèrmica, en el qual coin-

cideixen diversos factors: calma atmosfèrica pressió baromètrica alta i refredament de les capes més baixes de l'atmosfera, que donarà lloc a un augment molt important dels nivells de contaminants ambientals (146, 157).

Totes aquestes qüestions sobre la CONTAMINACIÓ AMBIENTAL són sovint conflictives. La població s'està sensibilitzant cada dia més d'aquests problemes i malgrat tot les indústries no corresponen a aquesta preocupació. Hem de pensar que encara actualment continua sent més rendible pagar una multa que adequar una indústria per a disminuir-ne la contaminació. És evident, doncs, que el problema de base és essencialment econòmic per l'alt cost que comporten els sistemes menys contaminants.

TAULA I

PROCESSOS QUE CAUSEN AMB MÉS FREQUÈNCIA
CONTAMINACIONS AMBIENTALS D'ESPAYS OBERTS:

1 - EXTRACCIÓ DE MATERIALS I PREPARACIÓ DE FONTS
D'ENERGIA

2 - INDÚSTRIA QUÍMICA

3 - CENTRALS TÈRMiques I MITJANS DE TRANSPORT

ELEMENTS DEL SISTEMA DE LA
CONTAMINACIÓ ATMOSFÈRICA

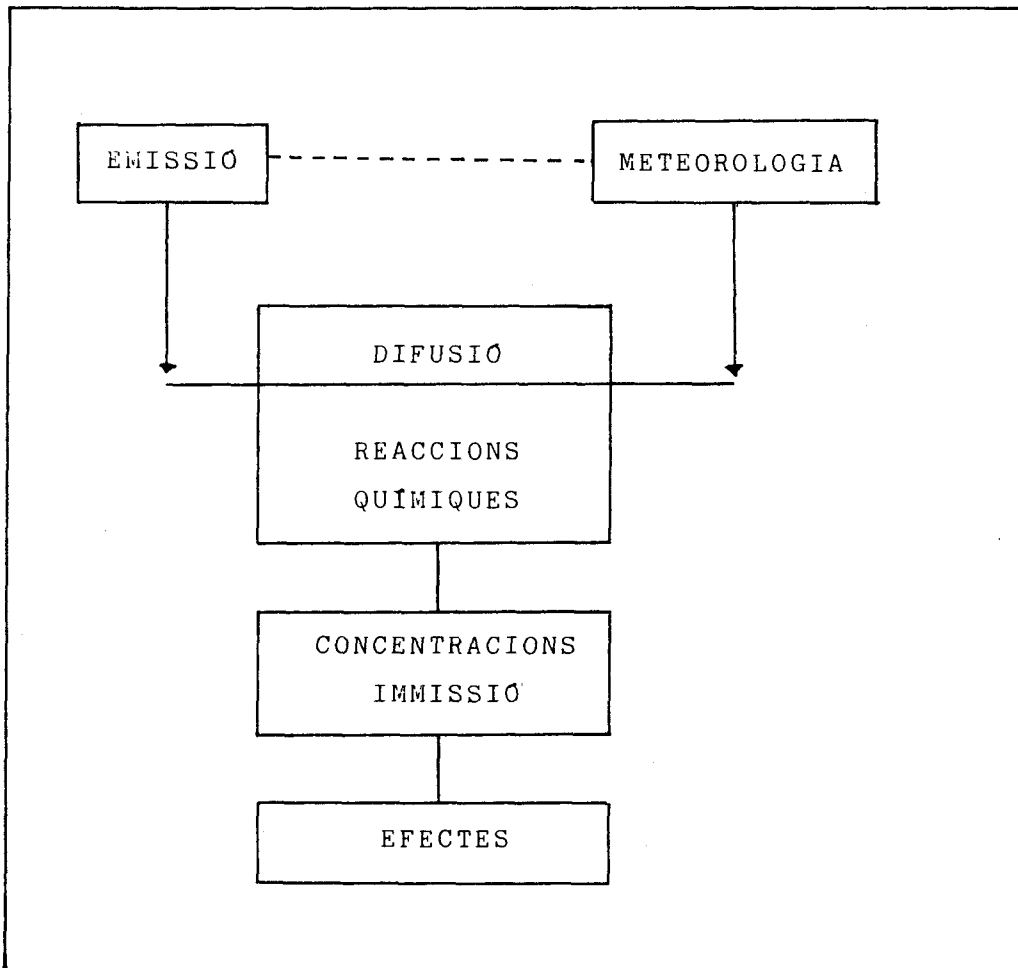


Fig. 1 - Presa de la Ref. 157

3.2.2.- CONTAMINACIÓ AMBIENTAL D'ESPAIS TANCATS O INTERIORS

La qualitat de l'aire en espais tancats és, de fet, un problema d'higiene pública i individual que ha rebut molta atenció en els darrers anys. Els progressos tecnològics i la necessitat d'estalviar energia, tenen de moment, a reduir la ventilació de locals tancats i a un ús més gran de la climatització artificial. Això exposa a l'individu, tant en el seu treball, com a la seva llar, a la inhalació d'un aire potencialment contaminat per productes molt diversos. Per una banda intervenen el tractament artificial del mateix aire, sotmès a escalfament, refredament i humidificació. Per altra banda també, determinats productes volàtils procedents de pintures i barnissos, de material aïllant, de gasos de combustió procedents de sistemes de calefacció, fum de tabac i productes emprats per a la neteja i manteniment, etc., participen en l'enrarament d'aquests ambients. Tot plegat forma part del que es denomina "síndrome de l'edifici malalt", que ha provocat diverses reunions científiques internacionals i la posta en marxa de programes de tipus preventiu.

En un informe recent de l'Oficina Europea de l'OMS es relacionen els agents contaminants en espais tancats que poden tenir un efecte nociu per a la salut. Es tracten, entre d'altres, del fum del tabac, NO₂, CO, radó, formaldehíds, SO₂, CO₂, ozó, asbestos, fibres minerals, substàncies orgàniques, etc. (56). Tots aquests agents es troben en concentracions variables a l'interior d'habitacions, locals de treball, escoles, edificis públics, etc.

Per tant, encara que a nivell popular sembla molt important el paper que juga la denominada Contaminació EXTERIOR, no hem d'oblidar la influència cada vegada més preponderant que, sobre la nostra salut, té aquesta CONTAMINACIÓ D'INTERIORS.

Al marge de la classificació anterior, s'han de tenir en compte també dos conceptes molt importants.

3.2.3.- LA CONTAMINACIÓ EXTERNA

La podem definir com l'existència d'agents contaminants a l'ambient que ens envolta, fora del nostre organisme. És fàcilment mesurable i podem influir en ella, controlant-ne les concentracions de contaminants ambientals. Aquest tipus de CONTAMINACIÓ es considera igual per a totes les persones a ella exposades.

3.2.4.- LA CONTAMINACIÓ INTERNA

Podem definir-la com a dependent de cada individu, de la seva actitud personal en relació al contaminant (més exposició, més inhalació), però, sobre tot, del poder de detoxificació de l'organisme, com ja veurem més endavant. Aquest tipus de contaminació ve condicionada per la càrrega enzimàtica i genètica individual, de tal manera que a igualtat de CONTAMINACIÓ EXTERNA, existirà un grau de CONTAMINACIÓ INTERNA per a cada per

sona i per a cada contaminant.

A la Fig. 2 es pot observar la xarxa d'interaccions possibles entre l'organisme i el MEDI AMBIENT (109).

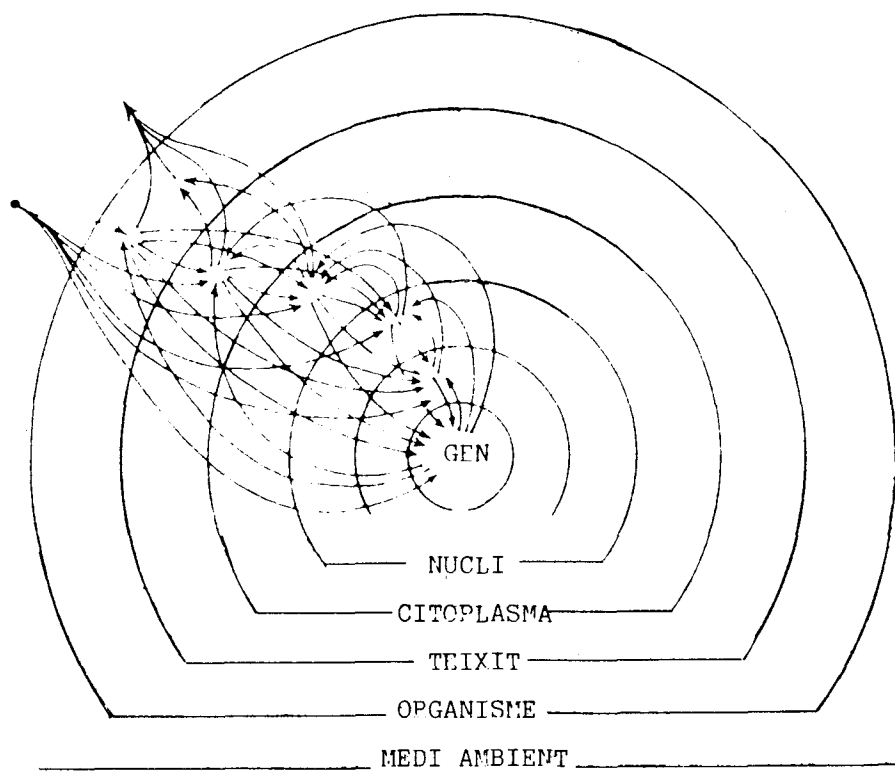


Fig. 2 - Xarxa d'interaccions possibles entre l'organisme i el MEDI AMBIENT.
Presca de la Ref. 109.

3.3.- AGENTS CONTAMINANTS

Existeixen dos tipus d'agents CONTAMINANTS:

3.3.1.- CONTAMINANTS FÍSICS

Aquests CONTAMINANTS, com són corrents elèctriques, vibracions, sorolls, radiacions, etc. (106), malgrat el seu interès, resten en aquests moments fora del nostre estudi.

3.3.2.- CONTAMINANTS QUÍMICS

Cap aquests tipus de CONTAMINANTS dirigirem, a partir d'ara, el nostre interès.

Aquestes substàncies químiques ja siguin sòlides (fums, pols), líquides (aerosol), o gaseoses, produeixen repercussions negatives i molt importants, com intoxicacions, al·lèrgies, irritacions, cremades, asfíxies i mutacions cel·lulars i càncer en el cas de certs productes molt concrets (129).

Pel que respecta a aquest punt, recordem el que ja dèiem en un principi tocant al gran increment en la producció de noves substàncies químiques en el que portem de segle, sobre tot a partir dels anys quaranta. Això ha fet que, actualment, existeixin en el món prop de 6 milions de productes químics enregistrats. L'ésser humà pot tenir contacte amb unes 60.000 substàncies químiques.

miques de les quals, per exemple, solament un 10 % han sigut sotmeses a investigació per a determinar si són o no cancerígenes.

L'Agència Internacional d'Investigació del Càncer (IRC), que depèn de l'OMS, i que és una de les fonts d'informació més exacte sobre el tema(177), ha demostrat de moment l'existència de 23 substàncies químiques i 7 processos industrials de gran poder carcinogènic per a l'home. Entre els productes químics dels que s'ha demostrat la relació causal entre exposició i càncer, s'hi troben els agents electrofílics als quals dediquem particularment aquest estudi.

3.3.2.1.- Agents electrofílics

Com indica el seu nom, aquests agents tindran una gran apetència pels electrons i reaccionaran ràpidament amb aquelles espècies que puguin oferir-los-hi.

El terme electrofílic s'aplica a les reaccions en las que no arriba a establir-se l'equilibri químic, com passa en la majoria de les reaccions de la Química Orgànica, substituint al terme "àcid de Lewis". En aquest tipus de reaccions la més o menys facilitat en que es dóna el procés, té el seu origen en la més o menys velocitat de la reacció. Així, doncs, no té sentit qualificar les espècies reaccionants d' "àcid fort" o "base dèbil", etc. pel simple fet de que els qualificatius de fortalesa aplicats a àcids i bases van lligats a la pròpia noció d'equilibri químic.

Aquests agents electrofílics tenen la propietat d'establir enllaços covalents amb el DNA, RNA, i/o proteïnes cel·lulars del nostre organisme produint lesions irreversibles que poden conduir a una mutagènesi i a una carcinogènesi (41). A més, i per si fos poc, existeixen algunes substàncies que no tenen propietats electrofíliques per elles mateixes, però que si arriben a introduir-se al nostre organisme i per diferents mecanismes enzimàtics, adquireixen aquesta facultat; són les nomenades substàncies potencialment electrofíliques que anirem veient més endavant.

3.3.2.2.- Presència dels agents electrofílics en el medi ambient

Entre els contaminants del MEDI AMBIENT s'hi troben molts electrofílics o potencialment electrofílics.

Així, per exemple, els Hidrocarburs Aromàtics Policíclics i les nitro-oleofines són importants constituents de la CONTAMINACIÓ ATMOSFÈRICA; el 3-metil-sulfurà forma part del nomenat "smog" i alguns halurs d'alquil i halurs d'alquè es troben abundantment distribuïts en el MEDI AMBIENT (41).

Els efectes d'aquests agents contaminants sobre la salut no queden ben definits degut a la gran quantitat de components atmosfèrics ja siguin contaminants o no, i a les interaccions químiques que poden donar-se entre ells. A més l'estudi comparatiu sobre la Contaminació Interna o real en zones industrials i no industrials, és complicat a l'intervenir altres variables com l'alimentació, els hàbits i l'exposició professional.

Malgrat tot, es pot afirmar que existeixen efectes nocius degut a l'increment de la polució atmosfèrica sobre la mortalitat i morbiditat dels individus amb patologia crònica de tipus cardiorrespiratori. En aquest sentit, són molts els estudis que demostren que les condicions meteorològiques i els nivells de contaminants tenen un paper important en el nombre i gravetat de les crisis d'agudització d'aquests malalts (159,171).

Exemples clàssics d'aquesta relació, són els episo-

dis d'agudització d'asma bronquial donats a Londres, a la Vall del Mosa (Bèlgica) o la de Donora (Pensilvània), relacionats tots ells de forma causal amb fenòmens d'inversió tèrmica. ()

Per altra banda podem trobar molts agents electrofílics en una gran quantitat de processos industrials (164). Especialment en la indústria Química, del plàstic, acabats tèxtils, goma de cautxú i cuir, intervenen d'alguna manera substàncies electrofíliques o potencialment electrofíliques de les que s'ha demostrat ja la seva relació causal entre exposició i càncer: clorur de vinil, benzè, gas mostassa i quitrà.

En la indústria del cuir, per exemple, s'empra el benzè i el clorur de vinil per a la reparació i producció de calçat, i en la soldadura de folrats plàstics respectivament.

Segons l'IARC, el benzè seria l'agent causal de l'aparició de leucèmia entre els treballadors, i el clorur de vinil estaria relacionat amb els tumors hepàtics, de cervell, sistema hematopoiètic i limfàtic, aparell digestiu, tracte urinari i mama.

El benzè s'utilitza també en la indústria de la goma i el cautxú i en els transports. Afecta concretament als treballadors de benzineres i conductors de camions i autobusos, ja que els derivats del petroli contenen aquesta substància en concentracions variables.

Un altre Contaminant que podriem qualificar de Social o d'autocontaminant (113), i que conté un gran nom

bre de substàncies electrofíliques, és el tabac (18, 113).

El fum d'una cigarreta conté substàncies com el clorur de vinil, benzopirens, nitrosamines, additius com el 3-fenil-5-metil-1,2,4-Oxadiazolè, acroleïna i altres productes procedents de la piròlisi dels aminoàcids (55,94,107,118 120) (Taula II).

El tabaquisme és un important factor de risc per a diverses malalties de cor i pulmó, així com per a certes neoplàsies (59,60 i 179). Malgrat que el fet és conegut des de fa anys, no s'ha traduït en una disminució del consum de tabac, ni de la proporció de fumadors al nostre país. Avui dia tots els experts estan d'acord en què el tabaquisme constitueix als països de desenvolupats, el primer problema de SALUT PÚBLICA, susceptible de prevenció (135,139,143-145).

Una vegada exposat el problema que representa la gran incidència d'aquests agents electrofílics al nostre MEDI AMBIENT, i la seva agressivitat cap al nostre propi ecosistema, creiem que queda justificat centrar la nostra Tesi Doctoral en l'estudi de determinats aspectes relacionats amb la seva exposició i detoxificació.

Coneixent a fons aquests processos podrem actuar no solament detectant la intoxicació, sinó també prevenint el risc d'exposició, quan existeixi.

TAULA II

Presa de la Ref. 18

SUBSTÀNCIES CARCINOGENIQUES/MUTAGÈNIQUES PRESENTS EN EL
FUM DEL TABAC

COMPOST	QUANTITAT/FUM D'UNA CIGAR.
Benzo (a)pirè	10-50 ng
Benzo (e)pirè	5-40 ng
Benzo (b)fluorantè	30 ng
Benzo (j)fluorantè	60 ng
Benzo (c)fenantrè	+
Benzo (a)antracè	40-70 ng
Crisè	40-60 ng
Dibenzo(a,h)antracè	40 ng
Dibenzo(a,c)antracè	+
Dibenzo(a,h)pirè	+
Dibenzo(a,i)pirè	+
Indeno(1,2,3-cd)pirè	4 ng
5-Metilcrisè	0,6 ng
2-Metilcrisè	7 ng
3-Metilcrisè	7 ng
1-Metilcrisè	10 ng
6-Metilcrisè	10 ng
2-Metilfluorantè	34 ng
3-Metilfluorantè	40 ng
3-Metil-1,2-banzantracè	+
1,12-Benzoperilè	+
5,6-Ciclopentè-1,2-benzan tracè	+
Dimetilflurantens	100 ng
2-Aminonaftalè	22 ng
4-Aminobifenilè	0,8-4,6 ng
o-Toluïdina	160 ng
x-Aminofluorè	+
N-Nitroso-dimetilamina	5-180 ng
N-Nitroso-metiletilamina	0,1-10 ng
N-Nitroso-dietilamina	0-10 ng
N-Nitroso-metilpropilamina	2 ng
N-Nitroso-etilpropilamina	1,6 ng
N-Nitroso-dipropilamina	1 ng
N-Nitroso-dibutilamina	0,3 ng
N-Nitroso-nornicotina	137 ng
N-Nitroso-piperidina	0,9 ng
N-Nitroso-anatabina	+
N-Nitroso-pirrolidina	2-42 ng

CONTINUACIÓ DE LA TAULA II

4(N-Metil-N-nitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona	0,11-0,4 μg
2-Nitropropà	0,7-1,2 μg
o-Nitrotoluè	21 ng
1-Metilindol	830 ng
Quinolina	1,7 μg
2-Metilquinolina	220 ng
8-Metilquinolina	120 ng
4 (5)-Metilquinolina	240 ng
3 (6/7)-Metilquinolina	110 ng
Benzo(f)quinolina	10 ng
Benzo(h)quinolina	10 ng
Fenantridina	10 ng
Dibenz(a,h)acridina	0,1 ng
Dibenz(a,j)acridina	3-10 ng
Dibenzo(c,g) carbazol	0,7 ng
Hidracina	24-43 ng
1,1-Dimetilhidracina	100 ng
Uretà	10-35 ng
Acrilonitril	3,2-15 μg
Compostos de Cadmi	9-70 ng
Compostos de Níquel	6-600 ng
Compostos d'Arsènic	12 ng
Compostos de Crom	1,4 ng
Compostos de Plom	240 ng
Poloni-210	0,04-1,3 pCi
Etanol	2 μg
Clorur de vinil	10-40 ng
Clorur de metil	160 μg
DDT	0-770 ng
Benzè	15-100 μg
Formaldehid	20-90 μg
Acataldehid	18-1,440 μg

+ Quantitats presents, però no conegudes.

4.- MECANISMES DE DEFENSA DEL NOSTRE ORGANISME EN FRONT DELS AGENTS ELECTROFÍLICS

A part dels sistemes que l'home utilitza com a barreres artificials per a protegir-se de la CONTAMINACIÓ AMBIENTAL, en general, l'organisme humà compta també amb diversos mecanismes de defensa per a mantenir l'estat de SALUT.

Per una banda contem amb sistemes que actuen com a barreres naturals, impeditint la penetració dels tòxics al nostre organisme: la pell, que actua com aïllant del MEDI, pilositats, mucositats, i, més internament, les barreres digestiva, hematoencefàlica i placentària.

Entre els sistemes generals o sistèmics, els principals, sense dubte són els processos de METABOLITZACIÓ.

4.1.- METABOLITZACIÓ I PRINCIPALS VIES METABÒLIQUES

El patró general del metabolisme dels productes químics és comú a totes les espècies. Aquestes reaccions són controlades per sistemes enzimàtics i és precisament en la naturalesa d'aquests enzims on estriben les variacions entre les diferents espècies i inclús dins d'una mateixa espècie (61).

Aquest patró bàsic és de tipus bifàsic, consistint

la fase inicial en reaccions d'oxidació, reducció i hidròlisi, i la fase final en el de síntesi o conjugació.

4.2.- METABOLITZACIÓ DELS COMPOSTOS ELECTROFÍLICS

Els agents electrofílics es biotransformen en l'organisme seguint el procés de conjugació amb el glutathion (GSH) (41,42). Les reaccions de conjugació poden portar-se a terme, en general, quan el compost conté un grup, normalment OH, COOH, NH₂ o SH, que és necessari per a poder-se combinar amb els radicals naturals de què disposa l'organisme per a formar metabòlits hidrosolubles polars i per tant fàcilment excretables. Si els compostos no presenten aquests grups reactius els podran aconseguir a través de la fase I del metabolisme ja sigui per oxidació, reducció o hidròlisi. Així doncs el fenol, que conté un grup hidròxil pot seguir la conjugació directament, però el benzè, que no conté cap dels grups abans esmentats, n'adquireix un, oxidant-se a fenol.

L'habilitat per formar conjugats de GSH sembla estar àmpliament distribuïda entre les espècies, i representa un mecanisme fonamental en l'eliminació dels compostos xenobiòtics.

4.2.1.- PROCESSOS QUE PODEN DONAR-SE PRÈVIAMENT A LA
CONJUGACIÓ AMB EL GLUTATION

El GSH pot combinar-se directament amb els compostos electrofílics, però existeixen substàncies poc o gens electrofíliques que mitjançant reaccions intermitges es converteixen en clarament electrofíliques, la qual cosa permet combinar-se més fàcilment amb el GSH.

Entre aquestes reaccions, la més freqüent és la de tipus oxidatiu, mediada per enzims localitzats principalment en la fracció microsomal del fetge de mamífers, en el nomenat sistema mono-oxigenasa hepàtic, en el qual el citocrom P450 juga un paper clau (61).

S'ha de tenir en compta que aquests processos oxidatius transformen a la substància inicial en un metabòlit actiu que en gran nombre de casos és molt més tòxic que el seu antecessor, donant-se la circumstància, com ja dèiem abans, de què compostos que no són electrofílics "per se", es transformen en electrofílics i mutagènics a través d'aquest procés d'oxidació. A aquest tipus de substàncies a les que es denomina "potencialment electrofíliques", se les ha de considerar tant tòxiques com a les que ja són electrofíliques en un principi, i seran també objecte del nostre estudi (164).

Així, per exemple, els hidrocarburs aromàtics són metabolitzats en els teixits fins a productes hidroxilats, pel sistema de l'enzim Aril hidrocarbon hidroxilasa (AHH) (47,73,94,95), un dels enzims d'aquest sistema mono-oxigenasa.

Durant aquest procés es formen epòxids transitoris, amb gran capacitat electrofílica, i que poden ser carcinògens molt més potents que els hidrocarburs dels que procedeixen. El diol-epòxid, intermediari molt reactiu, es forma a través d'una reoxidació dels dihidrodiols.

En els animals de laboratori s'ha trobat que les diferències en contingut de citocrom P₄₅₀ estan freqüentment relacionades amb la incidència de càncer. Així per exemple, després d'una exposició de l'animal de laboratori a substàncies carcinogèniques es produeix una inducció del sistema de les mono-oxidasses que augmenta l'activitat d'aquest sistema enzimàtic. En el ratolí aquesta inductibilitat ve determinada genèticament, apareixent llavors una més gran incidència de tumors en els animals més predisposats a la inducció (170). També en l'home s'han portat a terme diversos estudis per establir si també existeix aquesta relació, per exemple en el cas del tabaquisme i el càncer de pulmó (99,126, 134). Ja que el fet de fumar està relacionat epidemiològicament amb el càncer de pulmó, es va creure que la transformació maligna podria ser iniciada per l'exposició de l'epiteli bronquial als hidrocarburs aromàtics policíclics, presents en el fum del tabac, com el benzopirè, que ja s'havia demostrat capaç d'induir tumors malignes en els animals de laboratori.

En aquest sentit s'està investigant actualment sobre la possible relació entre susceptibilitat al càncer de pulmó i la inductibilitat metabòlica del benzopirè en cultius de limfòcits i macròfags, encara que els resultats de moment semblen més aviat contradictoris (110, 134).

4.2.2.- CONJUGACIÓ DELS AGENTS ELECTROFÍLICS AMB EL GLUTATION

El glutation (GSH), és un tripèptid (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina, GSH) present en totes les cèl·lules del nostre organisme. És, generalment, el compost sulfhidril més abundant en els teixits tant dels animals com de l'home, principalment en el citosol.

En alguns d'aquests teixits la concentració de GSH és molt elevada, com passa en el fetge, en la melsa, pàncreas, etc., depenent aquesta concentració, de l'estat nutricional, balanç hormonal, i del desenvolupament de l'organisme. Segons diferents estudis histoquímics el GSH es troba distribuït uniformement en fetge de rata, però no passa així en la resta de teixits, com ronyons, pulmons, etc.

Les propietats i funcions del GSH han sigut objecte de nombroses revisions (66,88,116), i en totes elles s'ha de destacar la relevància que es dóna al seu paper de protector biològic. Així per exemple, actua compensant els efectes tòxics del peròxid d'hidrogen gràcies a la mediació de la glutation pero-oxidasa, i davant dels agents electrofílics, objecte del nostre estudi, mitjançant l'acció de la Glutation S Transferasa (GST).

En aquest darrer cas, la conjugació catalitzada per la GST es dóna entre un nucleòfil biològic com és el GSH i els compostos que posseeixen un centre suficientment electrofílic (66). S'han classificat les reaccions

nucleòfiles del GSH en reaccions addició, (1) addició-eliminació (2) i en reaccions de desplaçament (3,4) (Fig. 3).

Hi haurà una reacció d'aquestes tres per a cadascun de l'àmplia gamma de substrats que existeixen.

Posteriorment, el conjugat de GSH resultant es desprèn dels residus de glutàmic i glicina, a través de dues reaccions enzimàtiques:

- sortida del residu "glutamil", mitjançant l'acció de la " glutamiltransferasa",
- sortida de la meitat glicil mediada per l'acció de la cisteinil-glicinasa.

Amb tot això el compost electrofílic queda, en realitat conjugat, a la resta de cisteïna del GSH. Aquest conjugat de cisteïna pot patir a més una N-acetilització gràcies a l'acció de la N-acetiltransferasa, originant-se un derivat d'àcid mercaptúric inactiu que s'eliminarà majoritàriament per l'orina (69,70,76) (Fig.4).

4.3.- GLUTATION S-TRANSFERASA (GST)

4.3.1.- NATURALESA

Els primers estudis sobre la GST es dirigiren principalment als diferents tipus del segon substrat involucrat (*) i es portaren a terme en preparacions enzimàtiques purificades només parcialment. Però aquests estudis revelaren que existia una aparent multiplicitat de formes de GST i que per altra banda cada reacció podia ser catalitzada per més d'un enzim (42). Conseqüentment s'adaptaren noms genèrics com "GST-Aryltransferasa", "S-epoxidotransferasa", "S-alkyltransferasa", "S-alkenotransferasa " i "S-aralkyltransferasa ", pensant que l'especificitat de cada enzim depenia directament del segon substrat catalitzat. Jakoby i cols. (88) més tard, arribaren a purificar diverses formes de GST en homogeneïtzat de fetge de rata i es va poder demostrar que realment existia una multiplicitat de formes de GST però que aquests enzims tenien una gran amplitud d'especificitat cap al segon substrat. És a dir, que qualsevol GST pot catalitzar la conjugació del GSH amb diferents tipus de segon substrat, però sembla existir una absoluta especificitat per al GSH com a substrat tiol. Al mateix temps els enzims purificats foren nome

(*) Tenint en compte que la conjugació mitjançant l'acció de la GST involucra dos substrats (el GSH i el xenobiòtic), a partir d'ara, quan ens referim al 2on. substrat, volem senyalar el compost electrofílic.

nats GST AA, A, B, C, D i E (68,70,71,89), basant-se en l'ordre invers en el qual s'anaven eluint de les columnes de carboximetilcel.lulosa durant el procés de la purificació (Fig. 5).

Tots aquests enzims representen al voltant del 10 % de les proteïnes solubles en el fetge de rata i aproximadament un 2 % en el fetge humà.

Les GST de fetge de rata tenen un pes molecular de 46,000 i consisteixen en dues subunitats que podriem considerar idèntiques, d'aproximadament el mateix pes molecular i amb un punt isoelèctric per damunt de 7 (69,90). Les denominades GST α , β , γ , δ , ϵ segons els seus punts isoelèctrics foren aïllades en el fetge humà i estan més estretament relacionades entre elles, que les aïllades en fetge de rata. De totes maneres els enzims aïllats en l'home i en la rata presenten moltes similituds: pes molecular idèntic, que equival a la suma de dos sub-unitats d'igual pes molecular; un punt isoelèctric alcalí; una selectivitat per al GSH com a nucleòfil tiol; una àmplia especificitat per a una varietat d'agents electrofílics (66,69,87).

Una conseqüència interessant de la purificació de les GST va ser la demostració de què la denominada GST-B del fetge de rata era aparentment idèntica a la denominada ligandina d'aquest mateix fetge (67). La ligandina és una proteïna bàsica (P.I. 9,0) del citosol, amb un pes molecular de 45,000 que fixa reversiblement diversos compostos, com bilirrubina, porfirines, bromosulfoftaleïna, esteroids i benzilpenicil·lines. La ligandina representa un 5 % del total de proteïnes extrai-

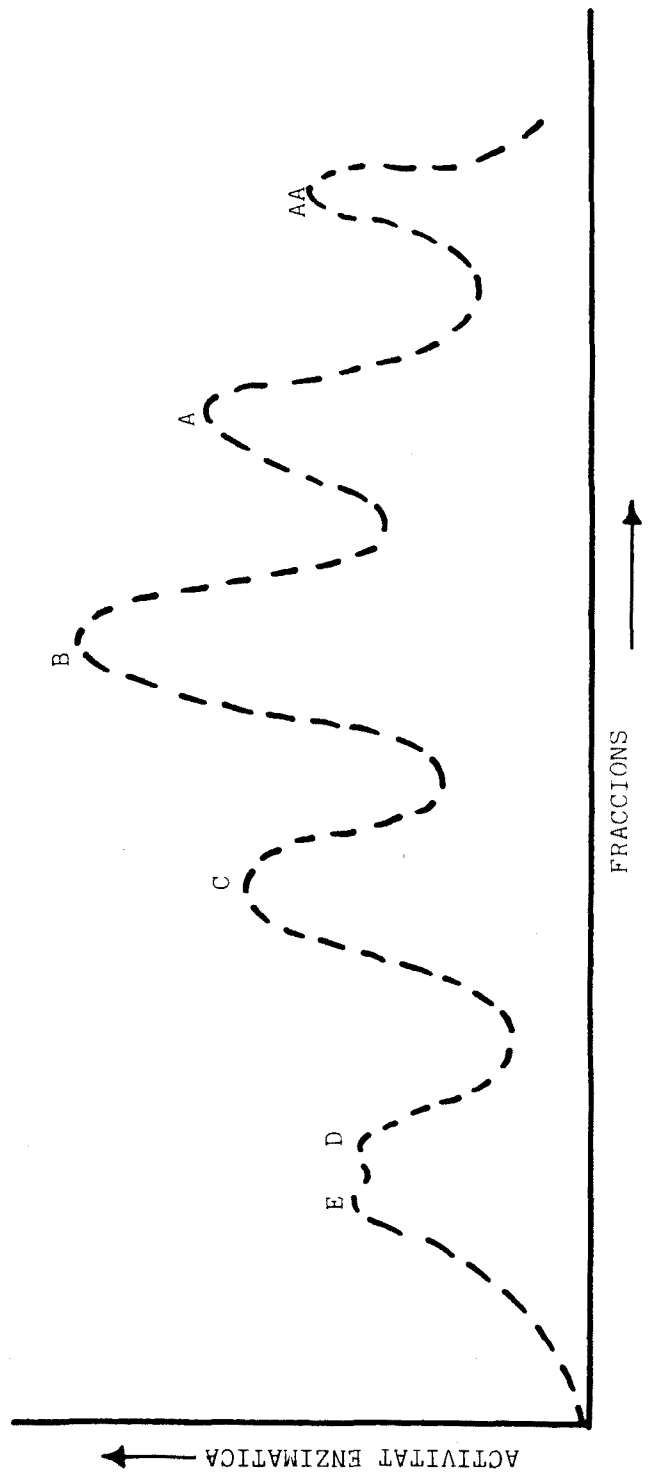


Fig. 5 - Procés de la purificació de la GST. Patró d'elució en columnes de carboximetilcel.lulosa.
(Presa de la Ref. 66)

bles del fetge de rata i està emparentada amb les nomenades proteïnes Y, proteïna I fixadora de corticoste-roids i amb la proteïna fixadora de colorants azoics. Per tant, a part de la seva importància fisiològica com a enzim, les GST també funcionen com a proteïnes fixadores i la ligandina (GST-B de fetge de rata) en particular, és probablement de gran importància en el control de l'entrada del flux d'anions orgànics des del plasma de fetge. Encara que s'ha de tenir en compte que altres anions que també es fixen a la ligandina, com bilirrubina i verd d'indocianina i que no reaccionen amb el GSH, són inhibidors competitiu de l'activitat de la GST.

4.3.2.- FORMA D'ACCIÓ

Contràriament a la majoria dels processos de conjugació, com la sulfatació o la glucuronidació, la conjugació amb el GSH no requereix una formació inicial d'alta energia intermediària que involucri a l'ATP, encara que tant la síntesi de glutatión a partir dels seus precursors els aminoàcids, com la posterior N-acetilació del conjugat de cisteïna, sí que utilitzen l'ATP. Al Kassab i cols. (2) suggeriren el 1963 que l'acció de l'enzim podria consistir en proporcionar un glutatión activat que pugués reaccionar amb l'agent electrofílic. Aquests autors observaren que la velocitat de reacció no enzimàtica del segon substrat amb el GSH augmentava paral·lelament a l'increment de la pro-

porció de GSH ionitzat, suggerint que el GS⁻ seria el nucleòfil reaccionant. Pot pensar-se doncs, que la funció de la GST podria ser la de promoure la ionització del grup sulfhídril del GSH, disminuint el seu pK (pK 9,2), incrementant així la seva nucleofilicitat, perquè d'aquesta manera el substrat electrofílic pugui reaccionar preferentment amb aquest GS⁻ abans que amb altres nucleòfils cel.lulars (133).

Per altra banda les GST poden unir-se també directament i covalentment amb certs substrats extremadament reactius, cosa que conduirà a una inactivació de l'enzim (88). Aquest tipus de reaccions de la GST precediran a la toxicitat cel.lular causada per certes substàncies, abans que la pròpia deplecció de GSH, com s'ha suggerit (115).

4.3.3.- LOCALITZACIÓ INTRACEL.LULAR

Com el GSH, la major part d'activitat GST està localitzada en el citosol (88). La resta d'activitat està distribuïda equitativament entre la resta de fraccions subcel.lulars.

4.3.4.- DISTRIBUCIÓ PELS TEIXITS

El poder predir la capacitat que tenen els teixits per a metabolitzar els compostos estranys és important, sobre tot si aquests teixits estan situats en llocs d'entrada o sortida de l'organisme, com per exemple els pulmons, la pell, el tracte gastrointestinal, el fetge i els ronyons.

La majoria dels estudis realitzats sobre l'activitat de la GST han sigut realitzats utilitzant preparacions relativament impurificades de teixit. Els avantatges de treballar amb aquest tipus de preparacions és que es reflexa més exactament la situació "in vivo".

L'activitat de la GST hepàtica és normalment molt més gran que la d'altres teixits com: ronyons, pulmons, intestí, pell, glàndules adrenals, múscul, melsa, placenta, sang total i plasma (36,64,65,156).

Per altra banda, aquesta activitat de la GST, depèn també del substrat utilitzat; així, en front de l'1,2 dicloro-4nitrobenzè és molt baixa en els teixits extra-hepàtics, i en canvi, és més gran per a l'iodur de metil, clorur de benzil i ciclohex-2-en-1-ona (41) (Taula III).

Les concentracions relativament altes de GSH i la gran activitat de la GST en el fetge suggereixen que aquest òrgan ha de ser una peça fonamental en la protecció de l'organisme dels efectes tòxics de certs carcinògens, per la seva més gran capacitat de conjugació enzimàtica amb el GSH.

TAULA III

Presa de la Ref. 41

ACTIVITAT ENZIMÀTICA DE LA GLUTATION S-TRANSFERASA EN DIFERENTS TEIXITS, QUANT A L'ACTIVITAT HEPÀTICA (a)

SUBSTRAT EMPRAT	RONYÓ	PULMÓ	COR	MELSA	SANG	CERVELL
1,2-Diclor-4-nitrobenzè	3	2	3	1	1	--
Iodur de metil	82	ND ^(b)	ND	ND	ND	ND
Clorur de benzil	73	4	3	13	--	--
Maleat de dietil	23	29	13	11	11	--
Ciclohex-2-en-1-ona	80	23	16	23	18	--
Benzilidè acetona	21	26	26	25	24	--
Naftalè 1,2-òxid	49	10	5	8	--	9
Metil "paration"	4	6	4	8	2	10
Diacinó	4	4	6	--	4	5
Sulfobromoftaleïna	4	1	1	1	--	6

(a) L'activitat enzimàtica hepàtica de la GST es considera 100 en cada cas

(b) ND No es detecta activitat enzimàtica GST

GSH.

Tantmateix la possible relació entre el mecanisme de conjugació amb glutatión i la susceptibilitat d'un òrgan determinat per als agents químics carcinògens, és una qüestió sense resoldre.

4.3.5.- DISTRIBUCIÓ PER ESPÈCIES

S'ha detectat activitat GST en el fetge de totes les espècies estudiades i aquesta activitat, normalment és més gran en els animals de laboratori que en l'home (44,173). De totes maneres es necessitaria estudiar més casos humans ja que els resultats que avui dia posseim es basen en un nombre bastant limitat de mostres. (Taula IV).

4.3.6.- ONTOGÈNESI

Alguns treballs mostren que l'activitat GST hepàtica o extrahepàtica d'animals de laboratori és inferior en el període neonatal que les obtingudes de la mare. Contràriament estudis realitzats en l'home demostren que l'activitat d'aquest enzim en el fetge fetal (>14s) és similar a la de l'adult (28,76). Si això es confir-

TAULA IV

Preses de la Ref. 28

ACTIVITAT ENZIMÀTICA DE LA GLUTATION S-TRANSFERASA HEPÀTICA EN DIFERENTES ESPÈCIES

ESPECIES	S U B S T R A T S				E M P R A T S	
	1,2-Diclor-4-nitrobenzè	Iodur de metil	Clorur de benzil	Eter 2,3-epoxi-propilfenil	Maleat de dietil	
Rata	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
Gos	2,80	0,16	0,69	0,42	0,39	
Conill						
d'Indies	2,46	0,50	3,14	1,06	0,93	
Ratolí	2,40	1,16	0,82	1,42	1,62	
Conill	1,40	0,36	0,47	0,14	0,22	
Hamster	0,40	0,56	0,82	0,80	0,90	
Home(adult)	0,080	0,26	0,21	0,19	0,13	
Home(fetus)	ND (a)	0,23	0,30	0,23	0,12	

(a)ND No es detecta activitat enzimàtica GST.

més, revelaria que en una situació paral·lela, l'home desenvoluparia molt més aviat la capacitat oxidativa dels agents estranys (Taula IV).

4.3.7.- INDUCCIÓ

La GST hepàtica és induïble pels inductors dels enzims metabòlics microsomals, com el fenobarbital, els hidrocarburs policíclics i certs compostos organoclorats.

L'etanol administrat crònicament sembla ser un inductor de l'activitat GST, incrementant a més les concentracions de GSH, encara que passi el contrari en una situació d'intoxicació aguda (80,121). També alguns antioxidants alimentaris s'han descrit darrerament com a bons inductors d'aquesta via metabòlica (11, 153).

En general aquesta activitat enzimàtica pot arribar a induir-se més de tres vegades variant per a les diferents espècies i depenent també del substrat i de l'agent inductor utilitzat en l'assaig. (Taula V).

TAULA V

Presa de la Ref. 96

INDUCCIO DE L'ACTIVITAT DE LA GLUTATION S-TRANSFERASA EN LA RATA DESPRES DE L'ADMINISTRACIO D'INDUCTORS ENZIMATICS (a)

TIPUS DE TEIXIT I SUBSTRAT EMPRAT	I N D U C T O R S		
	CONTROL	FENOBARBITAL	BENZOPIRE 3-METILCOLANTRE
FETGE			
Iodur de metil	16,6	23,1*	18,9*
1,2-Diclor-4-nitrobenzè	113	190 *	142 *
Clorur de p-nitrobenzilè	169	274 *	233 *
1,2-Epoxi-(p-nitrofenoxi)propà	11,6	15,2*	14,2*
			20,7*
			151 *
			240 *
			14,7*

(a) L'administració d'aquestes substàncies es portà a terme intraperitonealment durant 7-10 dies, i a dosis de 80,12 i 12 mg/Kg, respectivament.

* Augment significatiu de l'activitat enzimàtica (expressada en nmol/min/mg. prot)

4.3.8.- INHIBICIÓ

Encara que les conseqüències de la inhibició de les GST són més greus que les de la inducció, no s'ha fet un estudi a fons d'aquest procés. Se sap que aquests enzims són inhibits per les ftaleïnes, almenys en els insectes, per fàrmacs vasodilatadors coronaris com la benicidarona, certs contrastos radiogràfics, l'estirè, alguns metalls pesats i lligants que no són substrats com la bilirrubina, la indocianina verda i els esteroids sulfatats (32,40,45, 48-51).

La inhibició de la GST pels seus propis substrats ha sigut també descrita, encara que això seria degut probablement a què en molts casos el conjugat de SH format per l'inhibidor és també un substrat (72).

Es possible també, que l'acumulació de conjugats de GSH en un teixit concret "in vivo", pugui portar a la inhibició de la GST, el que conduiria al fracàs o a la impossibilitat d'aquest enzim per a detoxicar els esmentats compostos. Aquest fenomen podria donar una explicació per la toxicitat causada per l'administració de grans dosis de certes substàncies, més que per una possible deplecció de GSH (116,162).

4.3.9.- DIFERÈNCIES SEGONS EL SEXE

En diferents treballs s'han estudiat les possibles diferències de l'activitat GST, respecte a diferents substrats i entre ambdós sexes. Així, per exemple, el fetge de rata mascle, posseeix aparentment més activitat GST que el de la femella, donant-se a la inversa en el ronyó del mateix animal (96).

En l'home, ja sigui a través del producte de biòpsies o directament de fetge post-mortem, s'han fet diferents estudis, algun d'ells relativament extens (44), i no s'han trobat diferències significatives entre ambdós sexes.

4.3.10.- SUBSTRATS

Actualment es coneix un ampli rang d'agents electrofílics que segueixen el procés metabòlic de conjugació amb el glutatión, reacció, com ja hem vist, facilitada per les GST.

Donada la gran quantitat de substrats d'aquests enzims no ens sembla oportú desenvolupar ací aquest capítol. En aquest sentit, existeixen revisions exhaustives com poden ser, per exemple, les portades a terme per T. Hayakawa i cols. el 1975 (72) i L.F. Chasseaud el 1979 (41).

La Taula VI comprèn una relació de productes d'ús in dustrial habitual, electrofílics o potencialment electrofílics, i que, per tant, una vegada ingressats en l'organisme, seran substrats de la GST.

TAULA VI

Presa de la Ref. 164

SUBSTRATS DE LA GLUTATION S-TRANSFERASA
APLICACIONS INDUSTRIALS

SUBSTÀNCIA	APLICACIÓ INDUSTRIAL	CONC. MAX. PERMESA (mg/m ³) *
Acrilamida	Fibres acríliq.	0,3
Acrilonitril	Plàstics, revest.	45
Alcohol Alílic	Resines	5
Anilina	Tintes, solvent	19
Benzè	Solvent	30
Clorur de benzil	Tintes	5
Bifenil	Ag.transf.calor	1,5
Epiclorhidrina	Barnis., laques	20
Diclorur d'etilè	Solvent	200
Acrilat d'etil	Tèxtil, recobrim.	100
Glicidol	Solvent	150
Oxid de mesitil	Solvent	100
Acrilat de metil	Plàstics	35
Eter fenil glicídic	Estabilitzador	60
Estirè	Plàstics, cautxú, res.	420
Clorur de vinil	Plàstics	10
Clorur de vinilidè	Plàstics	40
o-Xilè	Solvent	435

* Segons la Conferència Americana d'Higienistes Industrials Governamentals.

4.4.- RESUM

En aquestes pàgines s'ha descrit com els agents elec
trofílics, que inclouen varis mutàgens i carcinògens co
neguts, es conjuguen amb el GSH, procés normalment cata
litzat per les GST. Aquesta conjugació representa pro
bablement un mecanisme protector i és el primer pas per
a la síntesi de tioèters per a la seva posterior elimi
nació de l'organisme. La protecció dels teixits en front
dels efectes tòxics dels agents alquilants o les radia
cions a través de tiols, ha sigut reconeguda ja fa molts
anys (84,152).

Les GST intervenen en aquest paper protector no sola
ment facilitant la conjugació del tòxic potencial amb
el GSH, sinó també unint-se inclús d'una forma covalent,
al tòxic, encara que sembla que el primer procés és el
més efectiu.

Els conjugats de GSH tenen la propietat d'excretar-se
també per la bilis, encara que aquest fet no ha sigut
estudiat profundament. Sembla que passa principalment
amb els conjugats de GSH d'alt pes molecular com per
exemple, els conjugats d'aflatoxina o de la bromosulfof
teïna.

En el seu pas per l'intestí, els conjugats de GSH es
converteixen en conjugats de cisteïna i/o altres produc
tes relacionats, inclús en metiltioderivats, que poden
ser extensament reabsorbits per a ser excretats eventual
ment per l'orina, o parcialment per la femta (41).

En teoria tots els agents electrofílics poden conjugar-se amb el GSH. Indubtablement l'extensió d'aquest fet i la seva utilitat protectora, dependrà de l'afinitat de les GST per l'electròfil i de la reactivitat química d'aquest darrer (electrofília), que pot haver sigut originada per una activació metabòlica inicial, com l'epoxidació.

Així doncs, la formació de l'epòxid tipifica el procés de la BIOACTIVACIÓ, ja que la majoria d'epòxids són reactius i per tant, potencialment tòxics per al nostre sistema biològic, i la conjugació amb el glutatión exemplificaria el procés de DETOXIFICACIÓ al facilitar la inactivació i l'eliminació del tòxic (63,164).

A part del sistema GSH-GST existeix també el sistema epòxid hidratasa que catalitza la hidratació de l'epòxid formant-se un dihidrodiol normalment. La reactivitat intrínseca d'un epòxid respecte a la isomerització espontània a fenol i la seva reactiva afinitat per aquest o per un altre sistema enzimàtic en les diferents espècies, podrien decidir quina ruta metabòlica és la dominant i per tant, la importància de la toxicitat d'aquest epòxid en una localització biològica concreta (Fig. 6).

A part d'aquests factors relacionats amb el procés metabòlic sofert, la toxicitat d'aquests compostos serà també el resultat d'altres factors com:

- Fracàs de l'electròfil generat en els microsomes per assolir el citosol, on estan localitzats el GSH i les seves GST associades.

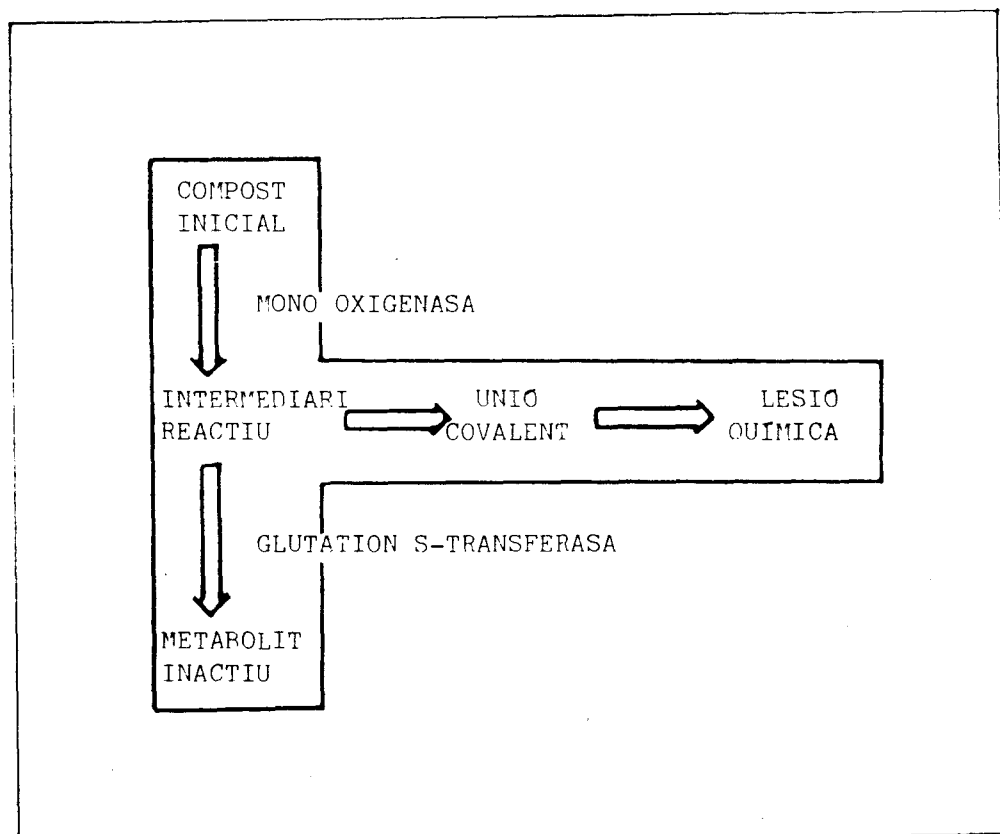


Fig. 6 - Esquema general de les reaccions de BIOACTIVACIÓ i DETOXIFICACIÓ al fetge.

Presa de la Ref. 164.

- Baixa afinitat de les GST per l'electròfil permetent que aquest darrer arribi a les macromolècules vitals en la cèl.lula.
- Inadequada activitat de la GST en l'òrgan diana.
- Inactivació o inhibició de les GST per l'electròfil, un altre electròfil o pel mateix conjugat de GSH.
- Deplecció del GSH necessari per assegurar l'adequada protecció, per sota del llindar, on els efectes tòxics es poden donar.

Aquesta darrera circumstància s'ha utilitzat per explicar l'hepatotoxicitat de dosis altes de productes com el bromobenzè i el paracetamol, però encara no ha sigut demostrat per a carcinògens i mutàgens. De fet, no existeixen fins ara estudis que demostrin clarament que tant el GSH com les seves GST associades puguin prevenir que el potencial carcinogen exerceixin els seus efectes, i l'evidència de que això passi és actualment purament circumstancial (11,79,126,153).

Mitjançant el recent desenvolupament de tests de "screening" de mutagenicitat(3,14,15,29,30)és possible valorar més fàcilment els efectes de la presència o addició de GSH i GST sobre la genotoxicitat dels agents electrófílics.

Així doncs, hem vist com el coneixement dels processos de metabolització d'aquests agents és essencial per a comprendre millor la seva forma d'acció i els mecanismes de la seva bioinactivació i ens porta a la certesa de que la via metabòlica del GSH-GST és una de les vies

protectores i detoxificadores més importants amb què
compta el nostre organisme.

5.- ELS TIOÈTERS URINARIS COM A INDICADOR BIOLÒGIC DE LA CONTAMINACIÓ INTERNA

Per a controlar el risc de toxicitat en un ambient contaminat per agents químics, es poden aconseguir paràmetres aproximats monitoritzant concentracions en l'aire ambiental. Aquest valors ens donaran una idea del grau de CONTAMINACIÓ EXTERNA, d'acord amb els "standards" vigents en cada país. Tantmateix el que realment ens revelarà el risc de toxicitat són, indubtablement, els indicadors biològics de CONTAMINACIÓ INTERNA, és a dir, la quantitat real d'absorció i de metabolització del compost estrany dins l'organisme. Aquest concepte de CONTAMINACIÓ INTERNA forma part normalment dels programes de monitorització biològica que inclouen, a part d'exàmens enzimàtics, encara en fase d'estudi (170), controls de concentracions del compost o dels seus metabòlits en sang, orina i aire expirat (180). De la mateixa manera que es determinen els metabòlits d'un fàrmac per a controlar la seva dosificació (167), serà molt útil també l'estudi dels metabòlits de certs agents contaminants. Així, per exemple, es determina l'àcid hipúric en l'orina en les exposicions al toluè, o la d'àcids mandèlics i fenilglixílic, també en orina, en els subjectes exposats a estirè. Aquests valors, reflexe de la CONTAMINACIÓ INTERNA, poden comparar-se llavors amb els nivells permissibles quan aquests hagin sigut ja establerts. En aquest sentit, doncs, la monitorització pot jugar un paper important en la prevenció de la toxicitat.

Per aquesta monitorització s'ha preferit emprar, sempre que això ha sigut possible, mètodes selectius per a detectar un compost en concret, encara que solament s'han valorat un nombre molt selectiu de tests.

Així i tot hem de tenir en compte que en un mateix subjecte poden estar exposats varis agents químics, i, per tant, un test no selectiu tindria més valor en aquest cas, sobre tot com una primera aproximació en el posterior desenvolupament dels tests selectius.

Entre els assajos no selectius de detecció d'exposició a tòxics, podem incloure la determinació de mutàgens en l'orina i fol·lículs pilosos (16-23,174,175), la detecció de purines metilades en l'orina, i la utilització d'hemoglobina o aminoàcids específics de l'hemoglobina eritrocitària com a control "in vivo" de l'exposició a agents alquilants (124).

Finalment, la determinació de Tioèters urinaris (TU), és també un mètode inespecífic que permet la detecció de l'exposició als compostos electrofílics.

Hem vist ja com els Tioèters s'excreten en forma de conjugats de GSH per la bilis i com conjugats de cisteïna, àcids premercaptúrics, àcids mercaptúrics i altres tioèters, per l'orina. Per tant, si en algun lloc de l'organisme es dona una reacció entre electròfils i GSH, serà d'esperar l'aparició en l'orina dels esmentats àcids mercaptúrics i altres tioèters. La major part d'àcids mercaptúrics que fins ara han sigut identificats tenen el seu origen en compostos estranys, encara que s'ha de tenir en compte que existeixen certs electròfils

endògens que també podran ser eliminats com àcids mercaptúrics.

Fa uns anys la determinació de Tioèters en els animals de laboratori exposats a compostos electrofílics, es portava a terme gravimètricament després del seu aïllament de l'orina. Stekol provocava la lliberació dels grups de tiol dels àcids mercaptúrics a través de l'acció d'un alcalí, basant-se en un procediment iodomètric. Bray i cols. determinaven els grups tiol lliberats per un àlcali mitjançant una reacció amb nitroprussiat (164). Aquests mètodes produïen sovint falsos resultats positius degut a les interferències d'altres substàncies.

També s'han portat a terme determinacions específiques d'aquests àcids per cromatografia de capa fina, cromatografia de paper, cromatografia de gasos i espectrometria de masses.

Més modernament s'han descrit varis procediments per a la detecció inespecífica dels tiocompostos, pels quals poden determinar-se un ampli grup de sulfurs divalents. En algun d'ells es poden diferenciar les distintes formes amb que aquests tiocompostos estan presents en l'orina: mercaptans (R-SH, també nomenats tiols) disulfurs (R-S-S-R) o tioèters (R-S-R).

Per a determinar els TU, el mètode més senzill consisteix en una hidròlisi alcalina dels tio-compostos, amb la posterior determinació dels tiols formats per la reacció d'Ellman (53). Aquest mètode fou descrit per Seutter Berlage el 1977 (152) i ha sigut àmpliament em-

prat per diferents grups (33,77,86, 148,166).

Van Doorn i cols. introdueixen el 1979 (163) vàries modificacions que consisteixen principalment en tractar l'orina mitjançant una extracció prèvia amb acetat d'etil per evitar la interferència de la cistina urinària, pre-existent en l'orina. Aquest mètode, doncs, serà bastant selectiu per als tioèters extraïbles en acetat d'etil en general, donant però, índexs molt baixos de recuperació per als conjugats de cisteïna.

5.1.- ELS TIOÈTERS URINARIS COM A INDICADOR D'EXPOSICIÓ A COMPOSTOS ELCTROFÍLICS

L'aparició de TU en un individu reflexa (si s'han exclòs possibles interferències amb altres tiocompostos exògens) que s'ha donat una exposició i una absorció d'una o més substàncies electrofíliques. Teòricament després d'una absorció completa d'un compost, el 100 % d'aquesta substància hauria de ser convertida i excretada com a TU; tantmateix el que passa realment és que l'absorció, en primer lloc, no és completa. De la quantitat absorbida només es detoxifica una part per conjugació amb el GSH i aquests conjugats s'eliminaran així mateix, per l'orina, també parcialment. Malgrat tot s'ha de pensar que aquestes proporcions hauran de ser constants per a cada producte i individu, cosa que mantindrà la signifiació de la concentració final del metabòlit. Per altra banda s'ha d'establir també que, quan

s'empra aquest assaig dels TU i es troben valors fora de la distribució normal, no haurem de concloure que l'exposició no s'ha donat. Si la determinació de TU s'ha portat a terme correctament l'absència d'un increment en les xifres de TU pot ser conseqüència d'un o més dels següents factors (164):

- L'hora de recollida de les mostres ha sigut incorrecta.
- El producte en qüestió ha sigut absorbit però només una petita part de la quantitat absorbita és excretada com a TU.
- El producte ha sigut absorbit i excretat però en forma de tioderivats no recuperables pel mètode.
- S'ha donat absorció però no detoxificació, o almenys no una detoxificació completa.

Especialment en aquest darrer cas és important combinar els assajos de TU amb altres mètodes inespecífics com el test de detecció de mutàgens en orina (91,105, 140,141).

APLICACIONES DE LA DETERMINACIÓ DE TIOÈTERS URINARIS (TU)

Des de que l'any 1879, E. Baumann i cols. (10), i, posteriorment el 1886, M. Jaffe i cols. (84), describiren la presència de tioèters en l'orina, s'han realitzat nombrosos estudis sobre les diferents aplicacions d'aquesta tècnica en distintes exposicions sobre tot

de tipus laboral.

Per un costat el grup finlandès de Vainio i Kilpikari inicien el 1978 un estudi en una planta química, amb la finalitat de detectar grups de treballadors amb un més alt risc d'exposició depenent del lloc de treball dins l'empresa. Amb la determinació de TU trobaren que els individus amb xifres més elevades respecte als controls eren aquells que treballaven en contacte amb el cautxú (160).

Per a completar aquest estudi, realitzen el 1981 un estudi semblant però aquesta vegada en una planta exclusivament de cautxú, trobant xifres molt elevades entre els seus treballadors, arribant inclús a poder distingir els qui manejaven el cautxú sense tractar (xifres de TU molt elevades) i els qui el manipulaven una vegada tractat (97). A més el 1982, descriuen una probable deplecció enzimàtica dels treballadors que començaven a treballar per primera vegada en aquesta empresa, degut segurament a la forta exposició que patien d'entrada (98).

Els holandesos Van Doorn i Henderson, han aplicat també aquesta tècnica el 1980, per a estudiar l'exposició dels treballadors d'una planta incineradora de residus químics (165) i d'una planta de fibres artificials exposats al disulfur de carboni (164), detectant en ambdós casos diferències significatives respecte als controls.

Aquest mateix grup havia estudiat anteriorment (1979) un altre tipus d'exposició particular: el tabaquisme.

Comparant grups de fumadors i no fumadors havien obtingut xifres significativament elevades de TU, depenent de la importància de la intoxicació tabàquica (163).

Posteriorment, el 1983, va ser el grup finlandès de Vainio que va estudiar aquest fet en relació al tipus de tabac americà consumit, ja fos de contingut "mitjà" o "baix" en quitrà, no trobant diferències significatives en els nivells de TU entre els fumadors d'ambdós grups (75).

5.2.- ELS TIOÈTERS URINARIS COM A INDICADOR DE DETOXIFICACIÓ DELS COMPOSTOS ELECTROFÍLICS

Com abans ja hem descrit, encara que el procés de metabolització ha sigut generalment considerat com un procés de bioinactivació, donant com a producte final un compost menys tòxic, actualment es coneixen molts exemples de la toxicitat de substàncies generades precisament a través de la biotransformació.

Ja hem descrit que el reactiu (metabòlit intermediari) pot formar-se durant l'oxidació enzimàtica d'alguns agents químics (BIOACTIVACIÓ). Aquests intermediaris, epòxids, ions de carboni, etc., tenen propietats electrofíliques i s'uneixen covalentment a les macromolècules cel.lulars donant modificacions estructurals com a primer pas de lesió. Per tant, i com ja hem subratllat anteriorment, no solament les substàncies electrofíliques seran tòxiques "per se" sinó també aquelles que una vegada dins l'organisme, i mitjançant els processos de biotransformació, donin intermediaris reactius electrofílics, és a dir, les substàncies potencialment electrofíliques.

Com ja sabem, tots aquests compostos electrofílics en general, poden o bé unir-se a les macromolècules tissulars o bé seguir la via de la DETOXIFICACIÓ, conjugant-se amb el GSH. La importància de la lesió química dependrà de les concentracions de reactiu intermediari, i aquesta concentració vindrà donada així mateix, pel balanç entre ambdós processos, el de BIOACTIVACIÓ i el

de DETOXIFICACIÓ.

Ja que la intensitat de tot procés metabòlic ve donada per la dotació enzimàtica de cada subjecte, ens trobem amb una gran variabilitat individual. Existiran persones amb un sistema d'activació, és a dir, un sistema enzimàtic oxidatiu molt desenvolupat, que generen una gran quantitat d'intermediaris reactius, i que a la vegada podran o no tenir un bon sistema de detoxificació, és a dir, en el cas que ens ocupa, un bon sistema GSH-GST, i a la inversa.

Podem, doncs, deduir que a igualtat d'exposició, xifres de TU elevades reflexaran una situació d'exposició, però també un bon sistema de detoxificació.

Al contrari, xifres de TU inferiors, significaran a grans trets, que l'individu:

- 1- és un mal activador o productor de reactius intermediaris, la qual cosa fins a cert punt no seria preocupant si el compost en qüestió necessita una preactivació (substància potencialment electrofílica) per a ser tòxic,
- 2- posseix un defectuós sistema de detoxificació que el faria en un principi etiquetable de subjecte amb alt risc de toxicitat.

Respecte a aquest punt hem de dir que encara no s'han portat a terme en l'home estudis que demostrin aquesta correlació entre xifres de TU disminuïdes i risc d'intoxicació, encara que sí que sembla evident el paper protector que exerceixen els mecanismes generadors dels TU (GSH GST).

Creiem que en aquest i altres estudis enzimàtics existeix un gran camp d'investigació, que resta encara desconegut i que podria contribuir a esclarir processos tant importants com és el de la carcinogènesi.

HIPÒTESI DE TREBALL

1.- HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS

El treball aquí presentat pretén demostrar el gran interès que representa l'anàlisi dels TU en les exposicions a agents electrofílics, com a tècnica de pronòstic i seguiment.

Per això hem desenvolupat el nostre estudi sobre diverses poblacions de risc potencial o demostrat, la majoria de les quals no havien sigut estudiades sota aquesta òptica fins ara.

- 1.1.- Exposició a la Contaminació Ambiental en diferents zones urbanes.
- 1.2.- Exposició laboral al Percloretilè (PER), tant en establiments de neteja en sec com en planta productora.
- 1.3.- Exposició laboral a les emanacions de l'asfalt, tant en treballadors de planta productora com de les brigades rodades.
- 1.4.- Exposició al fum del tabac, comparant els resultats obtinguts amb els nostres tabacs i els realitzats en altres països.

Per tot això, creiem que els resultats que es presenten en aquesta tesi poden ser de gran interès, no solament per la seva aportació en el terreny de la bio transformació farmacològica, sinó també en el camp de la Salut Pública, Medicina del Treball, toxicologia clí nica i de la Medicina en general, ja que això contribuirà a establir mesures de prevenció en casos concrets, així com a determinar els grups de risc d'entre les po blacions exposades a compostos electrofílics.

1.1.- OBJECTIUS QUANT A L'EXPOSICIÓ A LA CONTAMINACIÓ AMBIENTAL

Els estudis sobre la importància de la Contaminació Ambiental com a responsable d'efectes nocius sobre la salut, presenten una gran complexitat metodològica i, certes dificultats en la interpretació dels resultats.

En aquest sentit s'ha de diferenciar dos tipus de protocol: els epidemiològics i els experimentals. En els primers s'analitzen les relacions entre els nivells de contaminants i la incidència de determinats tipus de patologia, mitjançant enquestes, registres de consultes en els serveis d'urgències, etc.

Contràriament, els estudis de tipus experimental, pretenen provocar una situació de càusa-efecte, per a demostrar la causalitat d'un determinat agent contaminant sobre una patologia concreta, i inclús fixar la concentració lliurant d'aquests agents tolerable o compatible amb l'estat de salut. Aquest tipus de disseny permet també establir el possible sinergisme quan coexisteixen dos o més agents polucionants en un determinat ambient.

En qualsevol cas, els estudis epidemiològics, són sempre retrospectius i per tant, no aporten solucions a situacions passades. Per altra banda els estudis provocats són únicament útils per a situacions molt concretes i es desenvolupen sobre grups molt petits de voluntaris. Per tot això, el poder disposar d'un indicador biològic que permeti diferenciar el grau de contaminació

real d'una població, respecte a una altra, en fases precoces[?], facilita en gran manera la planificació i adopció de mesures de sanejament ambiental de forma immediata.

En aquest sentit, la determinació de TU en nuclis de finits de població representa un mètode d'acostament idoni per aquest tipus de situació. La inespecificitat d'aquesta tècnica no és un inconvenient donada la gran heterogeneïtat d'agents polucionants presents en l'ambient. Finalment, la simplicitat de l'anàlisi i el seu baix cost, justifiquen la seva utilització quan es compta amb un gran nombre de mostres com és el nostre cas.

1.2.- OBJECTIUS QUANT A L'EXPOSICIÓ LABORAL AL PER

El PER és un líquid incolor, lípid, d'olor característica i poc soluble en aigua, que pertany al grup dels disolvents clorats, que s'empra àmpliament en el rentat en sec (149-151).

Els disolvents clorats aparegueren per primera vegada en el mercat nord-americà a finals dels anys 20.

El tetraclorur de carboni va ser el primer a ser utilitzat, seguit del tricloretilè, i per últim el tetracloretilè o PER que va aparèixer ja en els anys 30. Durant alguns anys s'empraren quasi indistintament els tres disolvents, però actualment el consum del PER s'ha anat incrementant espectacularment degut, entre altres raons, a la seguretat de la seva utilització, la seva no inflamabilitat, i la seva poca toxicitat en relació amb els altres disolvents (4,119).

Tantmateix el PER té també uns riscos tòxics: una exposició excessiva pot produir efectes anestèsics i narcòtics, així com una irritació a la pell i mucoses, existint a més evidències clíniques de la seva toxicitat hepàtica i renal (37,54,103).

Per altra banda Parker ha descrit el 1978, la capacitat del PER per a produir hepatocarcinomes en el ratolí, així com el seu poder teratogènic en rata i ratolí (136), encara que aquests resultats han sigut molt

discutits.

S'han fet nombrosos estudis sobre la metabolització d'aquest producte i tots semblen indicar que el PER és eliminat ràpidament de l'organisme per l'inspiració, sent molt escassament metabolitzat. La seva biotransformació i eliminació és molt lenta. Es diposita sobre tot en el teixit adipós, mantenint una vida biològica d'aproximadament 6 dies (81,82,127,155).

Els metabòlits clorats d'aquest producte foren descrits el 1961 per Yllner, en orina de rata, demostrant-se la presència d'àcid tricloroacètic, d'àcid oxàlic i àcid dicloroacètic (178).

Es precisament en aquest treball, on l'autor insinua la possible existència d'un pas previ en la biotransformació del PER que passaria per la formació d'un epòxid.

La facilitat amb què el PER pot provocar hepatotoxicitat (en exposicions repetides o en casos d'intoxicació aguda), junt amb les dades poc concloents del seu metabolisme, justificaren el desenvolupament d'aquest estudi. En efecte, la importància de la funció detoxificant hepàtica, concretament l'activitat de la GST, es pot veure compromesa en un quadre tòxic per PER; per altra banda, la possibilitat apuntada per Yllner de que el PER origina epòxids transitoris, ens va fer suposar que el PER podria donar lloc a derivats electrofílics susceptibles de convertir-se en tioèters i, per tant, comportar-se com a substrats de la GST o inclús com a inhibidors de l'activitat enzimàtica.

La determinació d'aquesta nova via metabòlica seria de gran importància donada la toxicitat d'aquests possibles epòxids intermediaris, i ens permetria a més per l'anàlisi dels TU, detectar la normalitat o l'excés de les exposicions al producte, així com la més o menys capacitat individual de detoxificació.

1.3.- OBJECTIUS QUANT A L'EXPOSICIÓ LABORAL A L'ASFALT

El coneixement de la composició dels asfalts és relativament recent, considerant la seva llarga història d'aplicacions. El 1924 Nellensteiyn va ser el primer en proposar el sistema coloidal en el qual la fracció asfaltè era dispersada. Aquesta fase dispersa ha sigut ara reconeguda com una micel·las d'asfaltens i de components aromàtics d'alt pes molecular dels petrolens (104).

La determinació dels compostos de l'asfalt ha sigut sempre presentada com un desafiament per la seva gran heterogeneïtat i la complexitat dels hidrocarburs en ell presents.

Donada la quantitat de substàncies electrofíliques o potencialment alquilants que conté l'asfalt, l'eliminació de TU en els individus exposats posarà de manifest que aquestes substàncies han sigut metabolitzades via epòxid-GST-GSH.

La nostra hipòtesi de treball consisteix en aquest cas en correlacionar les xifres de TU amb el grau d'exposició d'aquests treballadors. Així doncs, l'increment de TU en aquests individus serà un índex biològic d'exposició. Ací també haurem de recordar que a més i per a un mateix grau d'exposició, l'augment de TU serà també l'expressió de la capacitat personal de detoxificació d'aquestes substàncies electrofíl·liques.

Encara que en aquest tipus d'empreses l'exposició és manifesta (l'acte d'asfaltar és un procés obert, on contínuament es respiren les emanacions asfàltiques), no s'han portat a terme estudis toxicològics profunds al respecte, possiblement per la dificultat que representa la complexa composició del producte.

1.4.- OBJECTIUS QUANT A L'EXPOSICIÓ AL FUM DEL TABAC

Els treballs de Doll i Hill, els clàssics informes del comitè d'experts de l'OMS i els milers de publicacions dedicades al tema (135) demostren el gran interès que desperta el tabaquisme en l'Administració i Organismes Públics (9,12,34,128,172), en la Medicina en general i en la investigació en particular (1,108,117).

Concretament en el camp dels AGENTS ELECTROFÍLICS, hem comentat ja els treballs de Van Doorn i cols. (163), que demostraven la correlació que existia entre el grau de tabaquisme i els nivells de TU, com a expressió del metabolisme dels diversos compostos electrofílics presents en la combustió del tabac.

Actualment es presta una gran atenció al consum de cigarretes baixes en quitrà i nicotina com a mitjà per atenuar la toxicitat tabàquica (78). Recentment s'ha dubtat de la pretesa salubritat d'aquest tipus de cigarretes pel que es refereix a la patologia ocasionada per aquest hàbit i als nivells de nicotina tant en sang com en orina (57).

Per tot això, hem cregut oportú definir aquí dos objectius concrets:

- conèixer els paràmetres típics de TU en els fumadors de marques de cigarretes més comunes al nostre país,
- estudiar els perfils dels esmentats TU en fumadors

de cigarretes baixes en quitrà i nicotina.

MATERIAL I MÉTODES

1.- GRUPS DE MOSTRES ESTUDIADAES

1.1.- ESTUDI SOBRE L'EXPOSICIÓ A LA CONTAMINACIÓ AMBIENTAL

La finalitat d'aquest treball radica en l'estudi de poblacions sotmeses directament o indirecta als efectes de determinats compostos electrofílics, en funció de la seva situació en diferents àrees urbanes.

1.1.1.- DISSENY EXPERIMENTAL

Aquest estudi es va portar a terme amb nens de 7 a 11 anys d'edat, i residents en alguna de les poblacions que, a priori, havia merescut la nostra atenció.

L'elecció de la mostra es va fer atenent els següents criteris:

- Absència de contacte directe habitual amb productes que podem considerar nocius (tabac).
- Elevat estat de salubritat en aquestes edats.
- Alimentació normalment equilibrada.
- Costums i ritme de vida ordenats i constants.

Tot això elimina possibles interaccions amb altres factors que podrien modificar la concentració final de TU.

Es van seleccionar 6 poblacions, dues d'elles allunyades més de 10 Km de nuclis industrials, i 4 properes als nuclis esmentats (0 a 5 Km) (Fig.7). La mostra analitzada del conjunt, que podem considerar no contaminat, ascendí a un total de 49 individus, i la perta-

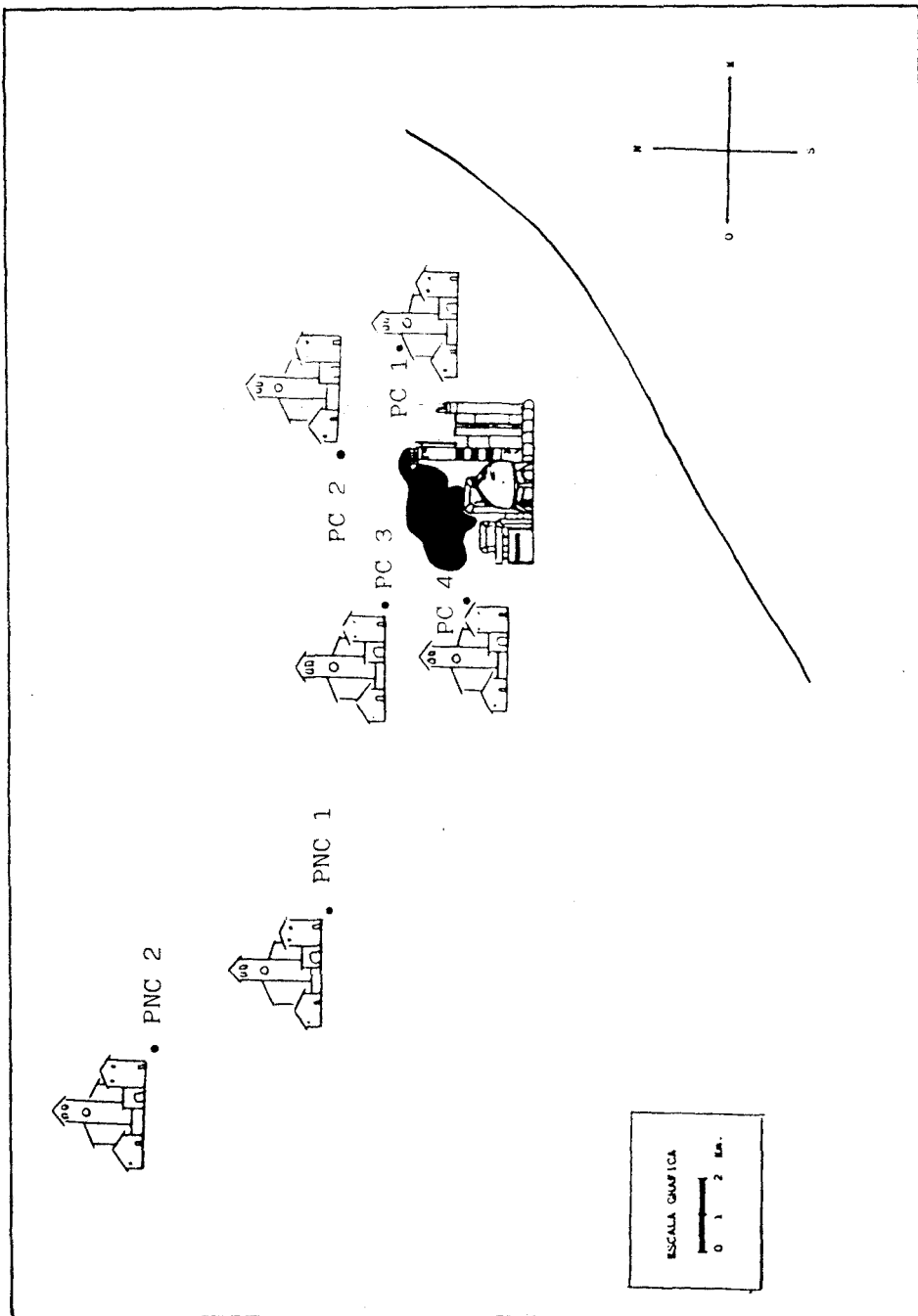


Fig. 7 - Situació geogràfica de las 6 poblacions estudiades: PNC 1 y PNC 2, es corresponen als nuclis no contaminats, y PC 1, PC 2 y PC 3 als considerats contaminats.

nyent als nuclis que considerem exposats, va pujar a 77 (Tabla VII).

1.1.2.- RECOLLIDA DE LES MOSTRES D'ORINA

Les mostres es van recollir simultàniament, el mateix dia i hora (concretament un dijous del mes de juny a les 16 h.) per assegurar la suficient homogeneïtat. Durant aquesta setmana en concret la situació meteorològica era qualificada de calma amb predomini de vents fluixos del 2on. quadrant (S.E.). Juntament amb les mostres, es van recollir les dades d'interès de cada individu (sexe, edat, lloc, hàbit tabàquic dels pares, medicació recent, etc.)

1.2.- ESTUDI SOBRE L'EXPOSICIÓ AL PERCLORETILE (PER)

Aquest estudi es divideix en tres parts:

- 1) Treballadors d'establiments de neteja en sec
- 2) Treballadors de planta productora de PER
- 3) Estudi metabòlic del PER en fetge de rata i ratolí.

1.2.1.- ESTUDI REALITZAT EN ELS TREBALLADORS D'ESTABLIMENTS DE NETEJA EN SEC

Aquest estudi es va portar a terme en dues vessants:

TAULA VII

POBLACIO	PROXIMITAT AREA IND.	Nº ♀	Nº ♂	PARES FUM.	PARES NO FUM.	Nº TOTAL
PE 1	1 Km	3	4	7	0	7
PE 2	1 Km	3	3	3	3	6
PE 3	1 Km	16	21	29	8	37
PE 4	1 Km	13	14	20	7	27
PNE 1	12 Km	15	23	22	16	38
PNE 2	15 Km	6	5	8	3	11

1.2.1.1.- Mostrari inicial

En aquest grup col.laboraren 5 dones que desenvolupaven la seva tasca en tintoreries en les que s'emprava PER com agent netejador. Les edats estaven compreses entre 32 i 55 anys, i cap d'elles era fumadora (Taula VIII).

Les mostres d'orina es van recollir a la nit durant tres dies feiners i en un dia festiu. Ja que la manipulació del PER en alguns casos no era continuada, es van escollir els dies setmanals de màxima exposició. En cada cas es van complimentar les dades d'interès: edat, sexe, i hora i dia de recollida de la mostra.

Hem de remarcar que la concentració mitja de PER a l'ambient laboral al final de la jornada de treball (19 hores), oscilava entre 15 i 45 ppm, és a dir molt per sota dels límits legals (100 ppm) vigents al nostre país.

1.2.1.2.- Estudi individualitzat a llarg termini

Les experiències es portaren a terme en una dona de 30 anys no fumadora, i treballadora en un establiment on s'usava constantment el PER per a la neteja de les peces de vestir.

L'estudi es va realitzar durant dues setmanes, recollint l'orina diàriament, al final de la jornada laboral, i a la darrera micció en els dies festius. Cada dia es prenia nota de l'hora de recollida de la mostra

TAULA VIII

	SEXE	EDAT	FUMADOR	LLOC DE TREBALL
CAS 1	♀	40 a	NO	TALLER
CAS 2	♀	32 a	NO	TALLER
CAS 3	♀	34 a	NO	TALLER
CAS 4	♀	55 a	NO	TALLER
CAS 5	♀	33 a	NO	TALLER

i altres dades d'interès com és el tipus de treball portat a terme, etc. Tampoc en aquest cas la concentració de PER a l'ambient laboral va superar els límits legals

1.2.2.- ESTUDI REALITZAT EN ELS TREBALLADORS D'UNA PLANTA PRODUCTORA DE PER

Aquest treball es portà a terme en 25 homes, treballadors en una planta productora de PER i les seves edats estaven compreses entre 21 i 59 anys (Taula IX).

Es van recollir tres mostres d'orina per cada individu. La primera corresponia al darrer dia del descans dels 4 que es concedeixen a aquest tipus de treballadors. La segona mostra corresponia al darrer dia de la primera setmana de treball i la tercera a l'últim dia de la segona setmana de treball. L'hora de recollida variava per a cada individu depenent del torn al qual pertanyia. Entre les dades que el treballador havia d'omplir, a més de les usuals, s'hi demanava el lloc específic de treball dins de la planta, i les hores teòriques d'exposició al PER.

La concentració ambiental de PER va ser imperceptible en les anàlisis que habitualment portava a terme l'empresa al llarg de l'any.

TAULA IX

		EDAT	FUMADOR	EXPOSICIÓ AL PER TEÒRICA
CAS	1	35	SI	++
"	2	47	SI	++
"	3	52	NO	+++
"	4	56	SI	+
"	5	51	NO	+++
"	6	57	NO	+
"	7	37	SI	+++
"	8	29	NO	++
"	9	53	NO	+++
"	10	50	SI	+
"	11	51	SI	+++
"	12	28	NO	+
"	13	39	NO	+++
"	14	24	SI	++
"	15	42	NO	+++
"	16	51	NO	+
"	17	27	SI	+++
"	18	34	NO	+
"	19	55	NO	+
"	20	23	NO	++
"	21	54	NO	+++
"	22	45	NO	+
"	23	59	NO	+++
"	24	25	SI	+++
"	25	21	NO	++

1.2.3.- ESTUDI DEL METABOLISME DEL PER EN FETGE DE RATA I RATOLÍ

1.2.3.1.- Efectes enzimàtics del PER després de la seva administració "in vivo" al ratolí

En aquest estudi es van emprar ratolins albins "swiss" mascles de 25 a 30 gr de pes. Els animals es van distribuir en 3 grups: grup 0 control; grup 1, tractats amb dosis orals de 0,2 ml de PER; i grup 2 amb dosis de 0,3 ml de PER (Taula X).

Entre els 4 i 10 minuts de l'administració del PER, es van sacrificar els animals mitjançant un cop al cap, extraient-los el fetge immediatament i mantenint-lo en fred fins el moment de l'homogeneització.

1.2.3.2.- Efectes enzimàtics del PER "in vitro" sobre fracció soluble de fetge de rata

Els assajos es portaren a terme en homogeneitzat de fetge de rata "Sprague Dawley" mascles d'aproximadament 200 gr de pes.

Els animals se sacrificaren mitjançant un cop al cap i el fetge extret es va mantenir en fred fins el moment de l'homogeneització.

TAULA X

GRUP	DOSI
0 n=6	Control
1 n=5	0,2 ml
2 n=2	0,3 ml

1.3.- ESTUDI SOBRE L'EXPOSICIÓ LABORAL ALS ASFALTS

Aquest estudi es divideix en dues parts:

1.3.1.- MOSTRATGE INICIAL

Col.laboraren 5 treballadors de sexe masculí d'una empresa d'asfalts de 23 a 44 anys d'edat, dels quals 3 pertanyien a la brigada ambulant i 2 a la planta productora. Tots menys un eren grans fumadors (+ de 20 c/dia) (Taula XI).

La recollida de les mostres d'orina es va fer a la nit durant tres dies feiners i un dia festiu. Conjuntament amb les mostres es va portar un control de dades personals: hàbit tabàquic i exposició laboral.

1.3.2.- ESTUDI INDIVIDUALITZAT A LLARG TERMINI

Aquesta experiència es portà a terme en un home de 23 anys, gran fumador (+ de 40 c/dia), treballador de la brigada ambulant d'una empresa d'asfalts.

L'estudi es va realitzar durant tres setmanes, en les quals es va recollir diàriament l'orina de la primera micció matutina, prenent nota de les dades habituals.

TAULA XI

	SEXE	EDAT	FUMADOR	LLOC DE TREBALL
CAS 1	♂	23 a	SI	BRIGADA AMBULANT
CAS 2	♂	41 a	NO	BRIGADA AMBULANT
CAS 3	♂	38 a	SI	BRIGADA AMBULANT
CAS 4	♂	44 a	SI	PLANTA PRODUCTORA
CAS 5	♂	27 a	SI	PLANTA PRODUCTORA

1.4.- ESTUDI SOBRE L'EXPOSICIÓ AL FUM DEL TABAC

Aquest estudi es va realitzar en tres parts:

- 1) Estudi general d'individus fumadors i no fumadors.
- 2) Estudi individualitzat de la progressió de l'hàbit tabàquic.
- 3) Estudi comparatiu entre fumadors de tabac "normal" i "baix en quitrà".

1.4.1.- ESTUDI GENERAL D'INDIVIDUS FUMADORS I NO FUMADORS

Es va portar a terme en 32 individus fumadors i 20 no fumadors d'ambdós sexes i d'edats compreses entre els 18 i els 35 anys. Entre els no fumadors participaren 9 homes i 11 dones, i entre els fumadors 18 homes i 14 dones. Es van establir quatre grups segons la intensitat de l'hàbit tabàquic: així el grup 0 es va referir als no fumadors, el grup 1 als fumadors de 1 a 10 cig./dia, el grup 2 als fumadors de 10 a 20 cig./dia i el grup 3 als de més de 20 cig./dia (Taula XII). Tots els individus estudiats consumien tabac de fabricació nacional. Es va recollir una sola mostra d'orina de cada persona, procedent de la darrera micció del dia, prenent nota de les dades personals, hàbits tòxics, etc.

TAULA XII

	♂	♀	TOTAL
G - 0	9	11	20
G - 1	4	3	7
G - 2	7	5	12
G - 3	7	6	13

1.4.2.- ESTUDI INDIVIDUALITZAT EN LA PROGRESSIÓ CONTROLADA DE L'HÀBIT TABÀQUIC

En aquest treball va col.laborar una dona de 25 anys fumadora de 20 cig./dia (tabac 17 mg/c quitrà), i no exposada, pel seu treball, a cap possible agent interferidor.

Abans d'iniciar l'experiència es va suprimir el tabac durant dos dies, per anar incrementant després el seu consum gradualment d'un a 20 cig./dia, durant el període de 20 dies que va durar l'assaig.

Les mostres d'orina es van recollir diàriament a les 22 hores.

En aquest cas, a més de les dades habituals es va tenir en compte també, els dies del cicle menstrual.

1.4.3.- ESTUDI COMPARATIU ENTRE FUMADORS DE TABAC "NORMAL" I "BAIX EN QUITRÀ"

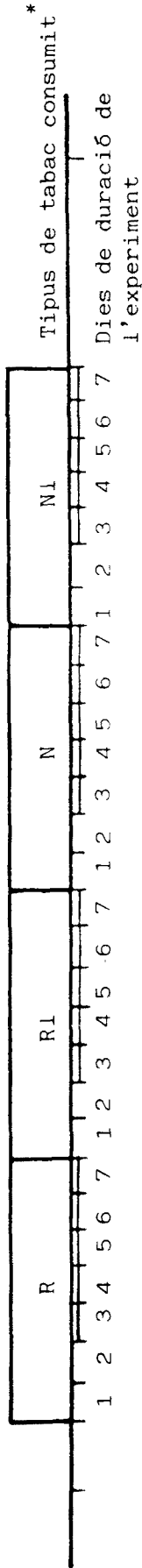
En aquestes experiències van participar un grup de 6 voluntaris, cinc homes i una dona, d'edats compreses entre els 22 i els 35 anys, i amb un hàbit tabàquic variable.

Se'ls proposà el consum d'una marca i tipus de tabac distint durant tota una setmana. Com a única condició es va establir que el nombre de cigarretes al dia consumides fos sempre el mateix i que les formes "baixes en quitrà" fossin de la mateixa marca que les formes

normals. Dels sis casos participants, cinc d'ells van fer consecutivament una prova comparativa amb tabac ros i negre, en les seves dues formes, "normal i "baix en quitrà" (R, R_L, N, N_L).

La recollida de mostres s'efectuà diàriament a la nit, durant els darrers cinc dies dels set que va durar cada exposició (Fig. 8).

Com és ja habitual, es varen prendre també les dades, en aquest cas fent especial esment al tipus de ta bac consumit (Taula XIII).



FF Dies de recollida de les mostres d'orina

R - Tabac ros

R1- Tabac ros, tipus "light"

N - Tabac negre

N1- Tabac negre, tipus "light"

(*) Durant tot l'experiment el nombre de cigarretes /dia consumit va ser el mateix per cada individu.

Fig. 8 - Diseny experimental de l'estudi comparatiu entre fumadors de tabac "normal" i "baix en quitrà"

TAULA XIII

	EDAT	SEXE	CIG./DIA	R	mg QUITRA			N _L
					R _L	N	N	
CAS 1	24	♂	20	19	10'5	23	11	
CAS 2	35	♂	20			23	11	
CAS 3	33	♂	14	18	9	21'9	14	
CAS 4	25	♂	20	19	10'5	23	11	
CAS 5	31	♀	20	19	10'5	23	11	
CAS 6	22	♂	15	19	10'5	23	11	

2.- MÈTODES EMPRATS

2.1.- DETERMINACIÓ DE TIOÈTERS URINARIS

2.1.1.- CONSERVACIÓ DE LES MOSTRES D'ORINA

Les mostres d'orina es van congelar a 20°C fins el moment de l'assaig. Mai no s'han mantingut en aquestes condicions més de tres mesos i no hem observat en cap cas una pèrdua de les propietats quant a tioèters i creatinina.

2.1.2.- DETERMINACIÓ DE CREATININES URINÀRIES

Donat que els valors de TU s'han d'expressar en mmols de SH/mol de creatinina es va determinar aquest paràmetre en totes les mostres d'orina.

D'antuvi s'emprà un AUTOANALITZADOR Aurora-Ultrolab, amb el que es van determinar les creatinines urinàries de la majoria de les mostres incloses en aquesta Tesi Doctoral.

En l'estudi sobre l'exposició a la Contaminació Ambiental, la creatinina urinària es valorà per la reacció de Jaffe (85), millorat per Heinegard i Tiderstrom (74), amb reactius "SIGMA".

En el cas de l'exposició laboral al PER en treballadors de la planta productora, s'emprà un "Kit" de creatinines de la casa Medi-Chem, basat també en el mètode

de Jaffe.

Ja que les orines amb escassa quantitat de creatinina, presenten xifres de TU anormalment elevades, s'eliminàren aquelles mostres els valors de creatinina de les quals anessin per sota de 5 mmols/l (165).

2.1.3.- DESCRIPCIÓ DE LES ANÁLISIS DELS TIOÈTERS URINARIS

El mètode utilitzat es basa en la reacció d'Ellman (53) i fou descrit per Van Doorn et al (161,164). En síntesi es tracta d'acidificar l'orina per a la seva extracció amb acetat d'etil, redissolució de l'extracte sec amb aigua i hidròlisi alcalina. Finalment es valoren per la reacció colorimètrica d'Ellman els grups SH alliberats en les dues fraccions, és a dir abans i després de la hidròlisi (Fig. 9).

2.1.3.1.- Tècnica detallada

Les orines es descongelen i se centrifuguen per eliminar les partícules sedimentables. El sobresurant de la centrifugació es reparteix en tres parts:

- a) una part de 2 a 3 ml es destina a la determinació de creatinina,
- b) una altra part d'almenys 5 ml, per a determinar TU,
- c) la resta es manté en congelació com a mesura de precaució -cas d'haver-se de repetir alguna determinació- fins la finalització de l'estudi.

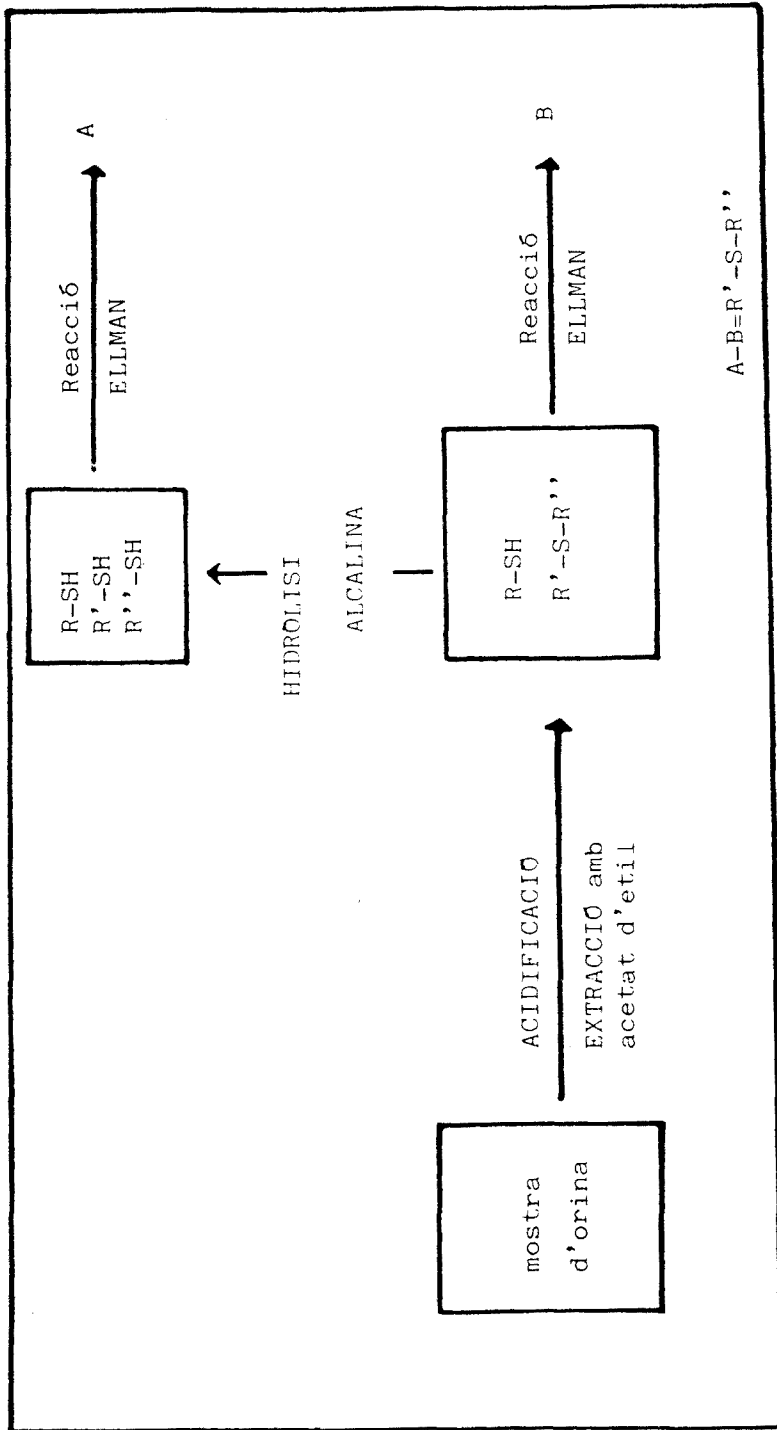


Fig. 9- Esquema de la determinació de la concentració de tioeters a la orina.

De cada mostra d'orina se'n prenen 5 ml i s'introdueixen en un embut de decantació, junt amb 0,25 ml de ClH 4N per acidificar afegint 8 ml d'acetat d'etil. L'embut de decantació es col.loca, junt amb les altres mostres i el que conté el "blanc" d'aigua destil.lada, en un agitador mecànic. Es connecta l'agitador i es col.loca a una velocitat idèntica per a totes les experiències (al voltant del 80 % de la seva velocitat màxima). Als 3-5 minuts de l'agitació s'obren les vàlvules dels embuts per alleugerar el contingut gasós, ja que sinó es podrien produir gelificacions del contingut. Es tornen a tancar les vàlvules i se segueix l'agitació fins a un temps total de 15 min.

Al finalitzar l'agitació, es col.loquen els embuts en posició vertical, en un embarrat preparat per aquesta finalitat, per separar les fases líquides. Amb molt de compte, es recull la part inferior en un tub d'assaig. La part superior es guarda en un altre tub d'assaig; aquesta fase és la d'acetat d'etil i conté tioèters extrets de l'orina junt amb grups SH lliures. La fase inferior d'orina (recollida en primer lloc) es torna a introduir a l'embut de decantació i s'afegeixen novament 8 ml d'acetat d'etil. Es repeteix la fase d'agitació i es procedeix a una nova separació. Ara, la fase inferior es descarta definitivament i la superior es reuneix amb la procedent de l'agitació anterior. El total de les dues fases d'acetat d'etil se sotmet a un procés d'evaporació total mitjançant un rotavapor fins obtenir un residu sec. Seguidament, s'afegeixen 2 ml d'aigua destil.lada a cada mostra, per a redissoldre el contingut de cada residu. En aquest redissolt tenim tioèters R-S-R i grups R-SH lliures; per a poder diferenciar els uns dels altres, dividim aquest redissolt en dues parts:

- a) 1 ml que utilitzem per a hidrolitzar els tioèters en la denominada hidròlisi alcalina,
- b) la resta, que utilitzem per a la lectura directa dels grups SH lliures.

Hidròlisi alcalina: S'introdueix 1 ml de l'extracte redissolt en un tub de cristall topazi, amb tap de rosca, s'afegeixen 0,5 ml de NaOH 4N i se satura l'ambient amb un corrent de N₂ durant 25 segons. Ràpidament es tapa el tub i es posa a ebullició durant 50 min. Al final, es refreden tots els tubs bruscament en gel. Una vegada freds, s'afegeixen 0,5 ml de ClH 4N per a neutralitzar la sosa, en cada tub.

En aquest moment disposem de la fase hidrolitzada i de la resta inicial del redissolt. Pensem que en la fase hidrolitzada ara tindrem únicament grups R-SH lliures, resultants dels tioèters que teniem prèviament i que hem "trencat" amb la hidròlisi, i els R-SH lliures que hi haguessin prèviament; en canvi, en la resta del redissolt inicial, només tindrem R-SH lliures no procedents dels tioèters.

Per tant, la determinació dels grups R-SH lliures en cadascuna de les dues mostres (hidrolitzat i no hidrolitzat) ens permetrà calcular la quantitat de SH procedents dels tioèters, ja que $R-SH \text{ de l'hidrolitzat} - R-SH \text{ del no hidrolitzat} = R-SH \text{ procedents dels tioèters}$.

L'anàlisi dels grups -SH es basa en la Reacció d'Ellman, que consisteix en valorar la intensitat del color groc que es forma al reaccionar els grups -SH lliures amb l'àcid di-tio-bis-nitro-benzoic (DTNB). Concretament consisteix en fer reaccionar 2 ml de tampó fosfat

Sorensen amb 0,25 ml d'extracte problema i 0,30 ml de solució de DTNB. El color groc que s'origina es valora a 412 nm en l'espectrofotòmetre. Els tioèters s'expressen en nmols de SH/mol creatinina.

2.1.3.2.- Elaboració de la recta patró

Per quantificar el nombre de mols de tioèters a l'orina es va establir una recta patró amb N-acetilcisteïna, segons el mètode d'Ellman (53) i com suggereix Henderson (161).

Per això es fan reaccionar 0,25 ml de concentracions diferents de N-acetilcisteïna amb 0,3 ml d'una solució de DTNB (0,4 mg DTNB per ml d'una solució al 1 % de citrat sòdic) i 2 ml de tampó fosfat Sorensen (0,5 M pH de 7,1).

Després de 5 min es llegeix l'absorbància a 412 nm.

Com es pot apreciar a la figura 10, la reacció colorimètrica és lineal per a concentracions de N-acetilcisteïna fins de 100 μ M.

El factor de correlació dels punts experimentals és de $r=0,999$ i l'equació de la recta resultant de la representació és: $y=0,006 x +0,008$.

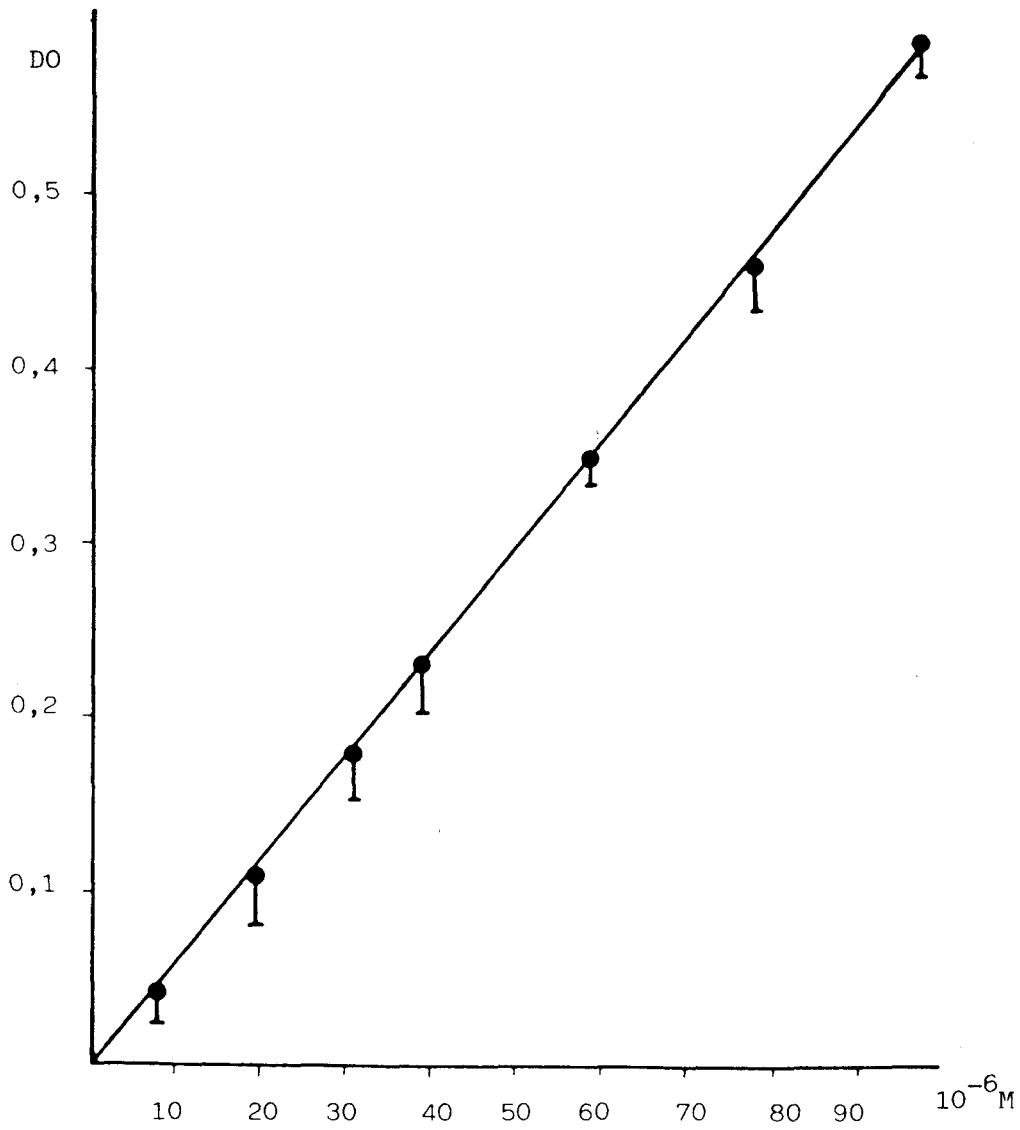


Fig. 10- Recta patró elaborada amb N-acetilcisteina, segons el mètode d'Ellman.

2.1.3.3.- Utillatge precís

Reactius i solucions

- N-acetil-L-cisteïna-Merck, diferents solucions entre 10 i 100×10^{-6} M.
- Acetat d'etil Koch-Light LTD.
- Acid ditiobis-2-nitrobenzoic (DTNB)
 - de Sigma
 - Solució preparada amb $0,4$ mg de DTNB per ml d'una solució de citrat sòdic al 1% .
- ClH i Na OH (solucions 4N). Reactius de grau analític.
- Tampó fosfat Sorensen
 - a base de fosfat monosòdic i disòdic a una solució $0,5M$ i pH $7,1$.
- N_2

Altres materials i utillatge

- Tubs de cristall topazi resistents a l'ebullició i tancats hermèticament.
- Agitador automàtic: Rotaterm (Selecta).
- Rotavapor -Heidolph amb adaptador per a múltiples valons.

- Espectrofotòmetre Shimadzu UV/120-02
- Espectrofotòmetre Pye Unicam PU 8.800 UV/VIS (Philips).

2.2. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA DE LA GLUTATION S-TRANSFERASA EN FETGE DE RATA I RATOLI

2.2.1.- PREPARACIÓ DE LA FRACCIÓ ENZIMÀTICA

Una vegada extret el fetge, es talla finament amb unes tisores, mantenint-se en fred durant tot el procés. A continuació es passa per un homogeneitzador Potter Elvehjem amb èmbol de tefló durant 1 minut (5 o 6 vegades) amb tampó fosfat potàsic (0,1 M, pH 6,5), en una relació pes:volum de 1:10. Aquest procés es porta a terme en un recipient amb gel. L'homogeneitzat obtingut se centrifuga sota refrigeració durant 1 hora i mitja a 10.000 x g i el sobrenatant resultant es filtra per a eliminar la capa lipídica superior. Aquesta fracció soluble pot mantenir-se congelada a -80°C sense que perdi la seva activitat enzimàtica.

2.2.2.- ANÀLISI DE L'ACTIVITAT GST, UTILITZANT COM A
SUBSTRAT L'ALCOHOL ALÍLIC

Aquest mètode es basa en la formació de tioèters a partir de l'alcohol alílic sobre glutatión (GSH) (69), amb posterior determinació de GSH no reaccionat pel mètode d'Ellman (53).

En un tub d'assaig s'introdueixen: 0,5 ml de fracció soluble nativa (- 8 mg/ml), 0,5 ml de tampó fosfat potàsic, i 2 ml de tampó preparat prèviament amb alcohol alílic (final 10 mM) i glutatión (final 1 mM). La incubació es porta a terme a 25°C. A intervals de temps variable s'extreuen aliquotes de l'esmentada incubació per a determinar el GSH lliure a través de la reacció d'Ellman.

S'empren com a blancs un mitjà d'incubació sense fracció soluble, un altre amb fracció soluble però sense tampó glutatión-Alílic, i un altre solament format per tampó fosfat potàsic.

Per establir la recta patró s'utilitza la reacció d'Ellman amb glutatión a diferents concentracions (5 a 60 x 10⁻⁶ M).

2.2.3.- ANÀLISI DE L'ACTIVITAT GST EMPRANT COM A SUBSTRAT EL CLORUR DE P-NITROBENZIL (CPNB)

Aquest és un dels mètodes més eficaços proposats per Habig (69) i es basa en el desplaçament espectral del CPNB en la zona ultravioleta al combinar-se amb el GSH per a formar el tioèter corresponent.

La longitud d'ona emprada (310 nm) va ser la màxima obtinguda en els diferents espectres, entre el moment de l'inici d'assaig i el seu final, després de la conversió enzimàtica completa del substrat. De la mateixa manera s'obtingué la diferència del coeficient d'extinció molar (Δ_{ϵ}).

En una cubeta d'espectrofotometria s'introdueixen, per aquest ordre: 1,1 ml de tampó fosfat potàsic 0,1 M. pH 6,5; 0,6 ml de GSH (final 5 mM), 0,05 ml de fracció soluble nativa (\approx 8 mg/ml) i 72 μ l de CPNB solució d'etanol 0,1 mM. Els volums i concentracions de GSH, FS i CPNB, poden ser variables segons els paràmetres a estudiar (veure resultats). La incubació es portà a terme a 25°C i la lectura es va realitzar com ja hem esmentat, a 310 nm. Les variacions de l'absorbància s'enregistren des de 0 a 5 minuts, mitjançant un programador termostatitzat per a 6 cubetes. Els increments d'absorbància observats a llarg termini reflectiren la formació del complex GSH-CPNB. El Δ_{ϵ} és de 1,9 mM⁻¹cm⁻¹ per aquest substrat i en les condicions de treball abans descrites. Per tant, un increment de DO de 1,9 es correspondrà a 1 mmol d'activitat enzimàtica.

Unitats d'activitat enzimàtica

Una unitat d'activitat enzimàtica es defineix com la quantitat d'enzim que catalitza la formació d'un μmol de producte/minut sota les condicions específiques de l'assaig.

Per altra banda l'ACTIVITAT ESPECIFICA es defineix com les unitats d'activitat enzimàtica per mg de proteïnes valorades pel mètode de Lowry (101). Per tant caldrà determinar les proteïnes en les diferents preparacions enzimàtiques.

2.2.4.- ESTUDI DE LA INFLUÈNCIA DEL PER SOBRE LA GST HEPATICA

En un grup d'experiències s'empraren fraccions solubles de fetges de ratolí pretractats amb PER, analitzant posteriorment l'activitat GST utilitzant com a substrat el CPNB. En aquest cas les condicions de treball per a valorar l'activitat GST foren: 1,1 ml de tampó fosfat potàssic, 0,1 M, pH 6,5, 0,6 ml de GSH (final 5 mM) 0,1 ml de fracció soluble nativa (≈ 8 mg/ml), i 72 μl de CPNB (solució en etanol 0,1 mM).

En un altre grup d'experiències s'avaluà "in vitro" l'efecte del PER sobre la GST. A tal fi s'incubà fracció soluble de fetge de rata amb PER en una proporció 6:1, sota agitació constant durant 10 minuts, per a facilitar l'escassa hidrosolubilitat del PER.

Les condicions de l'assaig foren les mateixes que en el grup d'experiències que s'acaba d'exposar.

Finalment, es va portar a terme un altre treball similar "in vitro", però solubilitzant el PER en etanol, així com el CPNB. Ací les condicions foren: 1,1 ml de tampó fosfat potàsic 0,1 M, pH 6,5, 0,6 ml de GSH (final 5 mM), 0,05 ml de fracció soluble nativa (\approx 8 mg/ml) 72 μ l d'una solució de CPNB i PER en etanol a diferents concentracions (CPNB de 0,05 mM a 0,25 mM i PER 1,8 i 2,18 mM).

2.2.5.- DETERMINACIÓ DE PROTEÏNES PEL MÈTODE DE LOWRY

En primer lloc es prepara una mescla a base de 100 ml de la solució Lowry A (20 g Carbonat Na, 4 gNa OH/1 H₂O), 1 ml de la solució Lowry B-2 (Tartrat Na-K 2 %).

La mostra a estudiar haurà d'ocupar un volum màxim de 0,5 ml, i si és inferior s'afegirà aigua fins arribar a l'esmentat volum. La quantitat de proteïnes oscilarà entre 10 i 50 µg de proteïnes.

Per cada mostra de 0,5 ml s'afegeixen 3 ml de la mescla preparada abans.

Transcorreguts 10 minuts s'afegeixen 150 µl de reactiu de Folin, agitant-se durant uns segons. Passats 30 minuts es procedirà a la lectura de l'absorbància a 750 nm.

La corba "standard" es determina a partir d'una solució de seroalbúmina de 100 µg per ml d'aigua.

2.2.6.- UTILLATGE PRECIS

Reactius i solucions

- Clorur de p-nitrobencil (CPNB) -Sigma.
- Percloretilè (PER) -de procedència industrial-.
- Reactiu de Folin Ciocalteus-Merck (Determinació de les proteïnes).
- Altres reactius de grau analític.

Altres materials i utillatge

- Material de vidre habitual.
- Cubetes de quars per a espectrofotometria de raigs UV.
- Homogeneitzador Potter Elvehjem amb èmbol de tefló.
- Centrífuga Heraeus-Christ Osterode (Refrigerada).
- Espectrefotòmetre Shimadzu UV/120-02.
- Espectrefotòmetre Pye Unicam PU 8.800 UV/VIS (Philips)

2.3.- MÈTODES ESTADÍSTICS EMPRATS

2.3.1.- ANÀLISI DE LA VARIÀNCIA

L'anàlisi de la variància és una important tècnica estadística de comparació de vàries mitjanes, basada en la comparació de la variància entre aquestes mitjanes a partir de la prova de F d'Snedecor (13,38,100).

A més, aquesta anàlisi ens permetrà estudiar la relació entre un caràcter qualitatiu amb k nivells, nomenat factor, i un caràcter quantitatiu.

Per a obtenir el valor F:

FONTS DE VARIACIÓ	SUMA DE CUADRATS	G.DE L.	VARIÀNCIA	F
ENTRE-GRUPS	$C_A = \sum_{i=1}^k (T_i^2/n_i) - T_G^2/N$	k - 1	$V_A = \frac{C_A}{(k-1)}$	$F = \frac{V_A}{V_R}$
RESIDUAL	$C_R = C_T - C_A$	N - k	$V_R = \frac{C_R}{(N-k)}$	
TOTAL	$C_T = \sum_{i,j} X_{ij}^2 - T_G^2/N$	N - 1		

Per a poder aplicar aquesta prova, les poblacions estudiades han de seguir les lleis normals i les seves variàncies han de ser homogènies.

2.3.2.- ANÀLISI DE LA VARIÀNCIA DE PLANS FACTORIALS

Aquest mètode s'aplica en aquelles experiències en les que s'investiguen simultàniament els efectes de vâries variables independents. Els plans experimentals d'aquest tipus reben el nom de "plans factorials" quan hi ha el mateix nombre d'observacions en cada una de les combinacions entre els nivells dels factors (13,38,100).

2.3.3.- PROVA D'SCHEFFE

Aquesta prova permet establir comparacions individuals entre les mitjanes dels (k) grups en una anàlisi de la variància (13,38,100).

Les condicions d'aplicació són les mateixes que les de l'anàlisi de la variància.

$$F = \hat{\varphi}^2 / (k-1) s_{\varphi}^2$$

$$\text{sent } s_{\varphi}^2 = V_R \sum_{i=1}^k c_i^2 / n_i, \quad k = \text{nombre de tractaments,}$$

V_R = Variància residual i ν_R = graus de llibertat de V_R .

Si $F < F(k-1, \nu_R, \alpha)$: Res no s'oposa a acceptar que el contrast φ és nul.

Si $F \geq F(k-1, \nu_R; \alpha)$: S'accepta la hipòtesi de que el contrast φ és diferent de zero amb risc α .

RESULTATS

1.- ESTUDI SOBRE L'EXPOSICIÓ A LA CONTAMINACIÓ ATMOSFÈRICA.

A la Fig. 11 s'exposen els resultats obtinguts en les diferents poblacions quant als seus valors de Tio èters urinaris segons una distribució de freqüències. Per a realitzar l'anàlisi estadística dels resultats es varen tenir en compte dues possibilitats:

- 1) Pertànyer o no a una població considerada com a contaminada.
- 2) Conviure o no amb familiars fumadors.

En el primer cas tots els individus pertanyents a les quatre poblacions considerades contaminades (Fig. 11) es van agrupar com si es tractés d'una mostra homogènia, fent igual amb els pertanyents a les 2 poblacions no contaminades.

En el segon cas es van agrupar, per una banda els subjectes que conviuen amb familiars fumadors i per l'altra els que no.

S'aplicà llavors una Anàlisi de la Variància factorial amb dos factors (CONTAMINACIÓ/FUMADOR PASSIU), el que ens va permetre estudiar a més les interaccions que poguessin existir.

Els resultats obtinguts foren:

- Per al factor CONTAMINACIÓ ATMOSFÈRICA - Existeixen diferències significatives ($p < 0,05$)

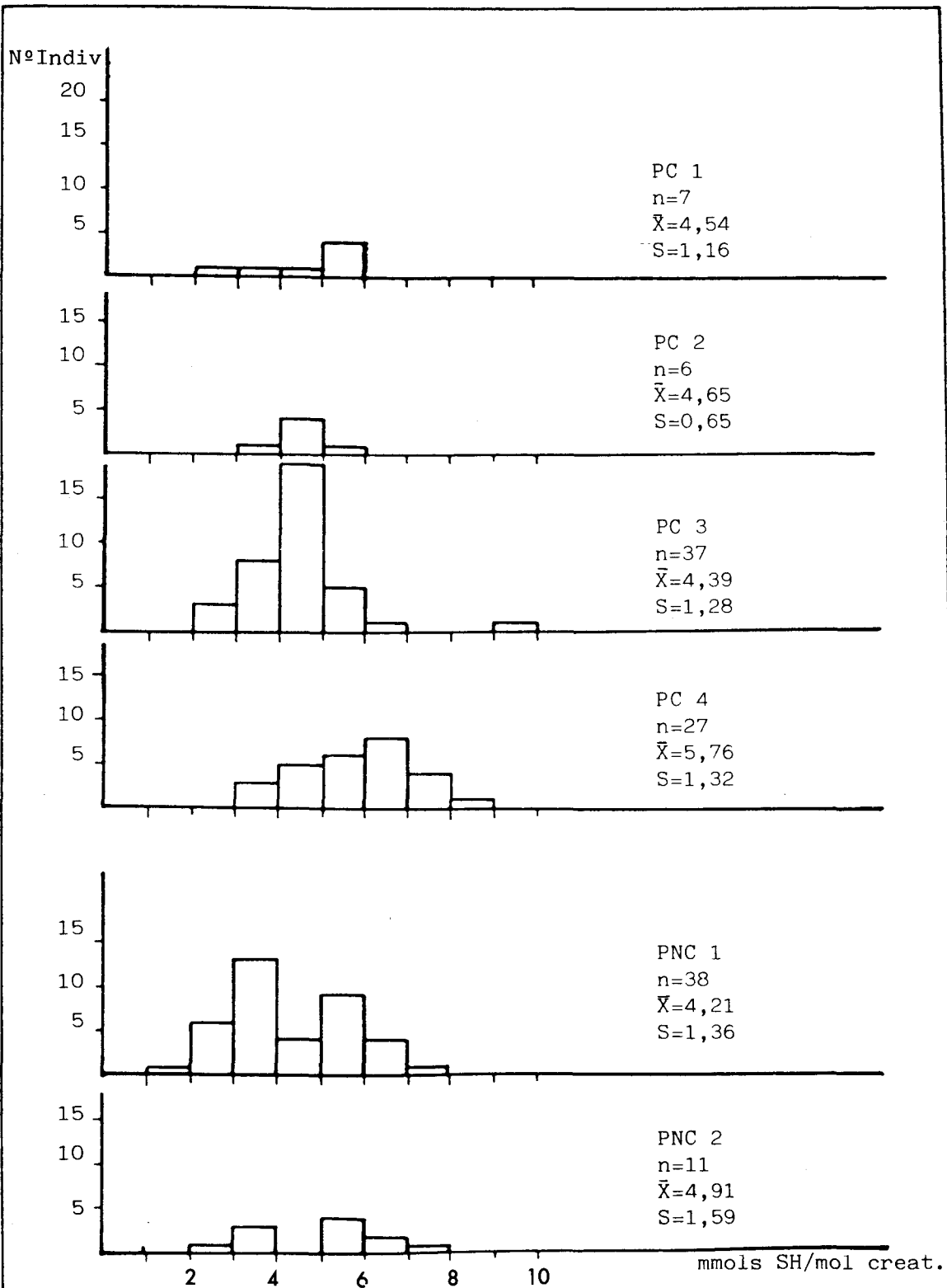


Fig. 11 - Histograma de la distribuci3 de freqüències dels valors de TU en les diferents poblacions estudiades. (Poblacions considerades com a contaminades, PC i no contaminades, PNC).

- Per al factor FUMADOR PASSIU - No existeixen diferències significatives.
- Per a possibles interaccions entre ambdós factors
 - No hi ha diferències significatives.

2.- ESTUDI SOBRE L'EXPOSICIÓ AL PER

2.1.- ESTUDI REALITZAT EN ELS TREBALLADORS D'ESTABLIMENTS DE NETEJA EN SEC.

2.1.1.- MOSTRATGE INICIAL

Els resultats s'expressen a la Fig. 12.

Podem veure l'existència d'un increment dels Tioèters urinaris al llarg de la setmana laboral.

Els valors màxims s'aconsegueixen el diumenge, fet que evidencia un desfasament entre l'entrada del tòxic i l'increment dels TU. En cada cas es calculà el valor de la pendent de la recta resultant.

El valor mitjà de totes aquestes pendents permet establir l'equació $y=0,36x$.

Així mateix el factor de correlació oscil·là entre 0,95 i 0,99 en tots els casos.

2.1.2.- ESTUDI INDIVIDUALITZAT A LLARG TERMINI

En la Fig. 13 podem observar com l'increment progressiu durant la setmana laboral, constatat ja en l'ante-

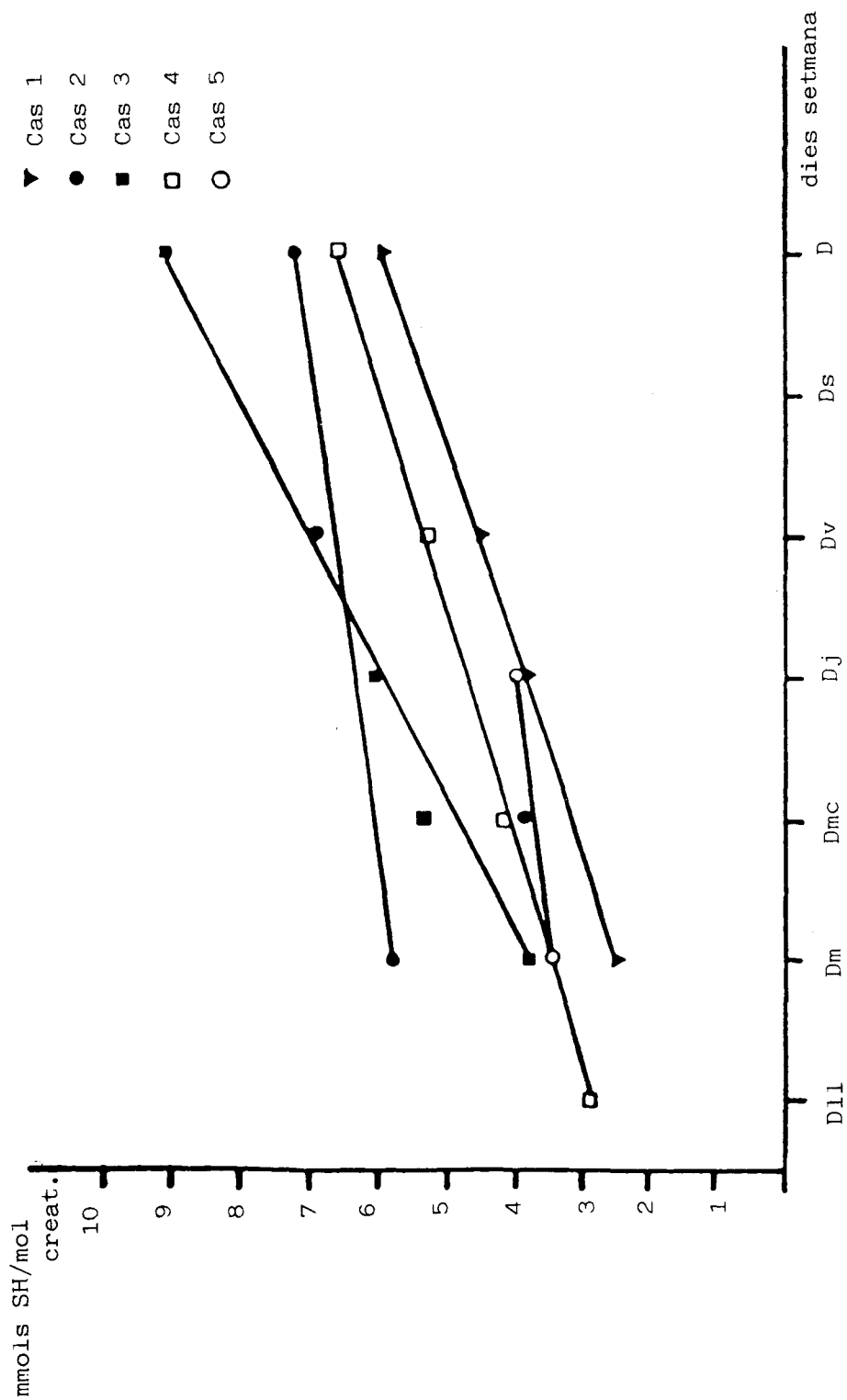


Fig. 12 - Tioèters urinaris en els 5 casos estudiats, al llarg d'una setmana d'exposició laboral al PER. Les unitats dels TU, s'expressen en mmols de SH/mol creatinina.

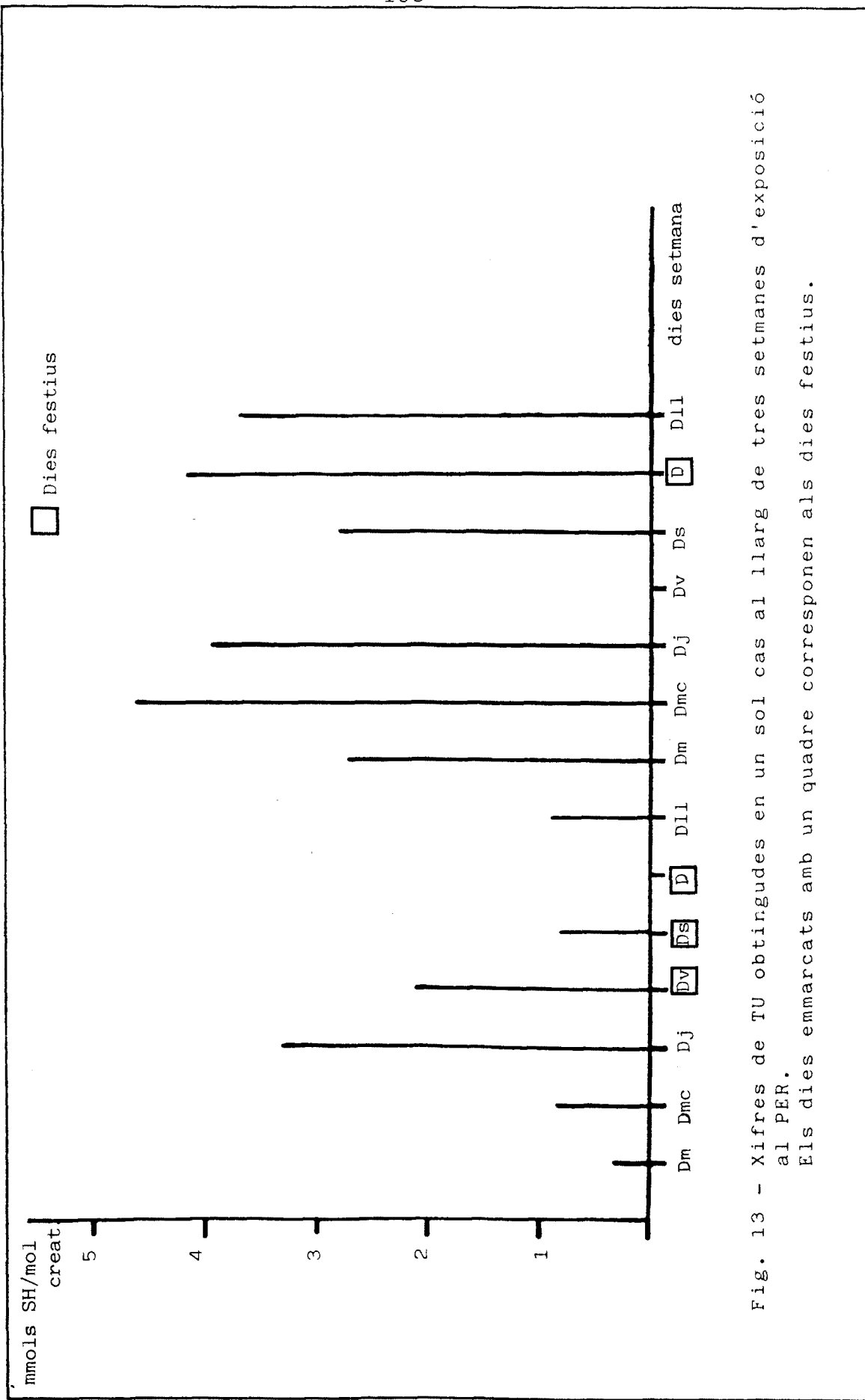


Fig. 13 - Xifres de TU obtingudes en un sol cas al llarg de tres setmanes d'exposició al PER.
Els dies emmarcats amb un quadre corresponen als dies festius.

rior estudi, es repeteix cíclicament durant les dues setmanes que va durar l'experiència. La coincidència de tres dies festius en la primera setmana, va impedir que l'acumulació de tioèters fos massa elevada encara que és útil per a confirmar el descens dels TU en absència de contacte amb el percloretilè.

2.2.- ESTUDI REALITZAT EN ELS TREBALLADORS D'UNA PLANTA PRODUCTORA DE PER.

Per a poder estudiar els resultats obtinguts, s'agrupen els valors en tres grups segons el dia en que va ser recollida la mostra d'orina (G-0 el darrer dia festiu, G-1 el darrer dia de la 1^a setmana de treball, G-2, darrer dia de la 2^a setmana de treball).

En la Fig. 14 poden observar-se els resultats obtinguts en aquests tres grups, expressats per una distribució de freqüències segons les xifres de TU donades en mmols de SH/mol de creatinina.

L'estudi estadístic es va realitzar en primer lloc considerant totes les mostres analitzades, mitjançant una anàlisi de la variància entre aquests tres grups. D'aquesta prova no es va obtenir diferència significativa.

Posteriorment s'eliminaren aquells valors pertanyents a individus fumadors per a descartar la possible interferència de l'hàbit tabàquic (Fig. 15).

En aquest cas, per a poder aplicar l'anàlisi de la variància, més potent que qualsevol prova no paramètrica, es va procedir a efectuar un canvi de variable amb la finalitat d'obtenir un test d'Homogeneïtat de Bartlett positiu. Per tant, es va definir una nova variable que fou el logaritme neperià de la variable original.

En aquestes condicions es va procedir a l'anàlisi de la variància, que tampoc en aquest cas va donar diferèn-

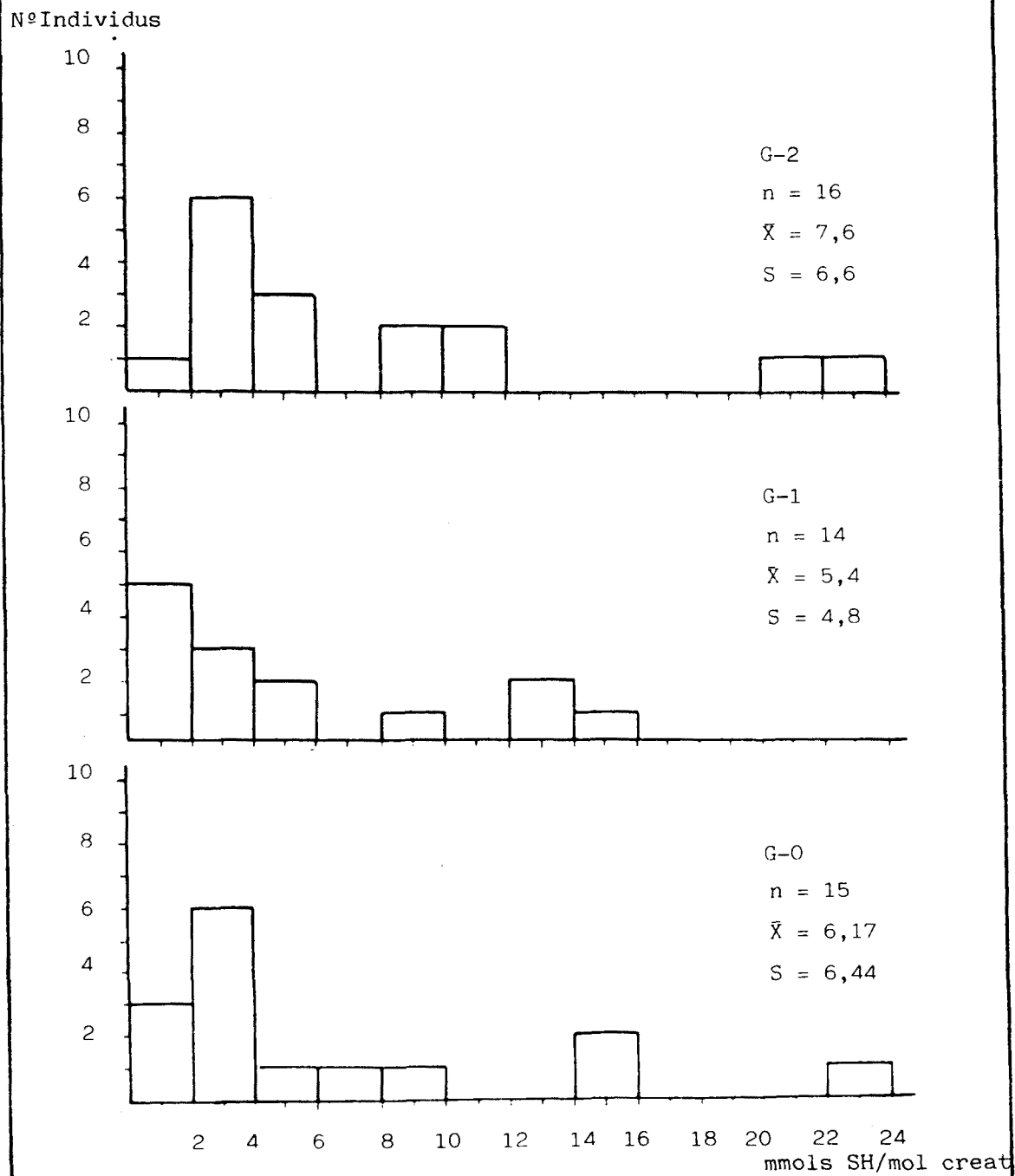


Fig. 14 - Histograma de la distribuci3 de freqüències dels valors de TU en els treballadors de la planta productora de PER. Els tres grups estudiats G-0,G-1,G-2,s'han establert segons el dia de recollida de l'orina (festiu i laborables,respectivament).

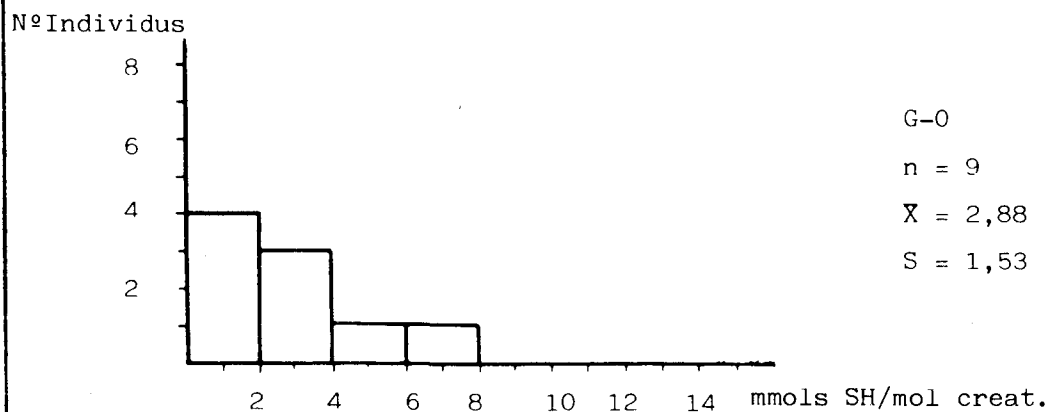
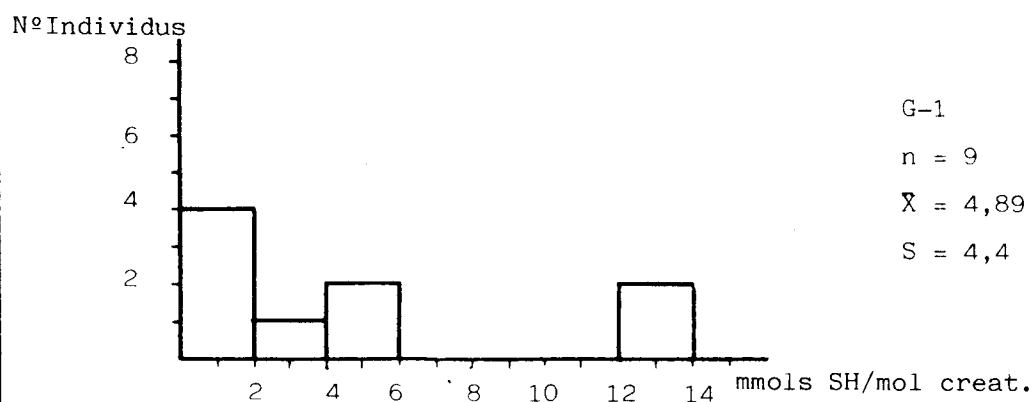
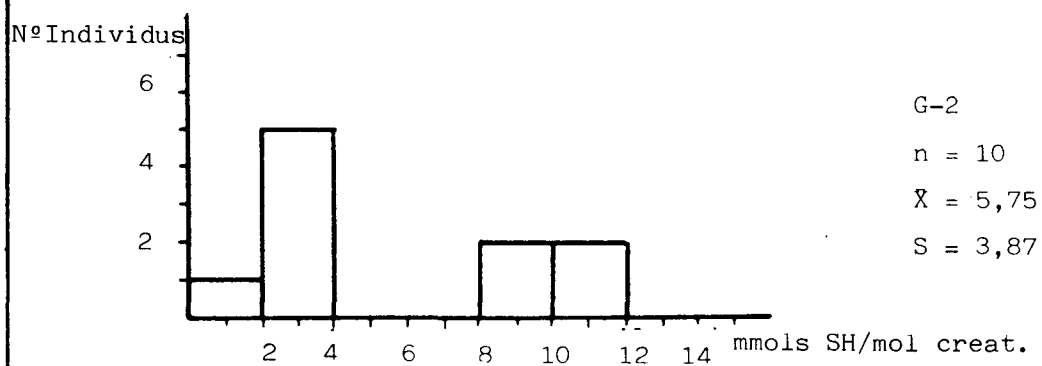


Fig. 15 - Histograma anterior (Fig. 14) en el qual s'han eliminat aquelles xifres pertanyents a individus fumadors.

cia significativa.

El disseny inicial d'aquest estudi pretenia estudiar l'evolució dels nivells de TU de cada individu, mitjançant l'aplicació d'un test de dades aparellades o dependents. No obstant, els valors de creatinina urinària foren molt baixos en nombroses mostres, pel que s'han hagut de descartar molts resultats. Això ha impedit l'aplicació del test estadístic abans esmentat.

2.3.- ESTUDI DEL METABOLISME DEL PER EN FETGE DE RATA I RATOLÍ

2.3.1.- CARACTERITZACIÓ DE L'ENZIM

En la Fig. 16 es mostren els resultats en fracció soluble de fetge de rata, utilitzant l'alcohol alílic com a substrat. Recordem que aquesta tècnica valora l'activitat GST mitjançant el càlcul del Glutation residual (GSH) no consumit en la reacció.

Com es pot observar aquest mètode és poc sensible, donant una activitat enzimàtica mitja de $0,002 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot.

Contràriament, si s'empra el CPNB com a substrat s'obté una bona caracterització enzimàtica (Fig. 17), ja que aquest mètode resulta molt més sensible que l'anterior.

Així doncs, en la Fig. 17A, s'expressa l'activitat enzimàtica GST, en funció de la concentració de GSH emprada (CPNB=0,1 mM, FS= ,1 ml.).

En la Fig. 17B l'activitat enzimàtica és estudiada en funció de les concentracions de CPNB en el medi (GSH 5 mM. FS 0,1 ml.)

En la Fig. 17C es representa l'increment de la Densitat Òptica a 310 nm en funció del temps (CPNB 0,1 mM, GSH 5 mM i FS 0,1 ml.).

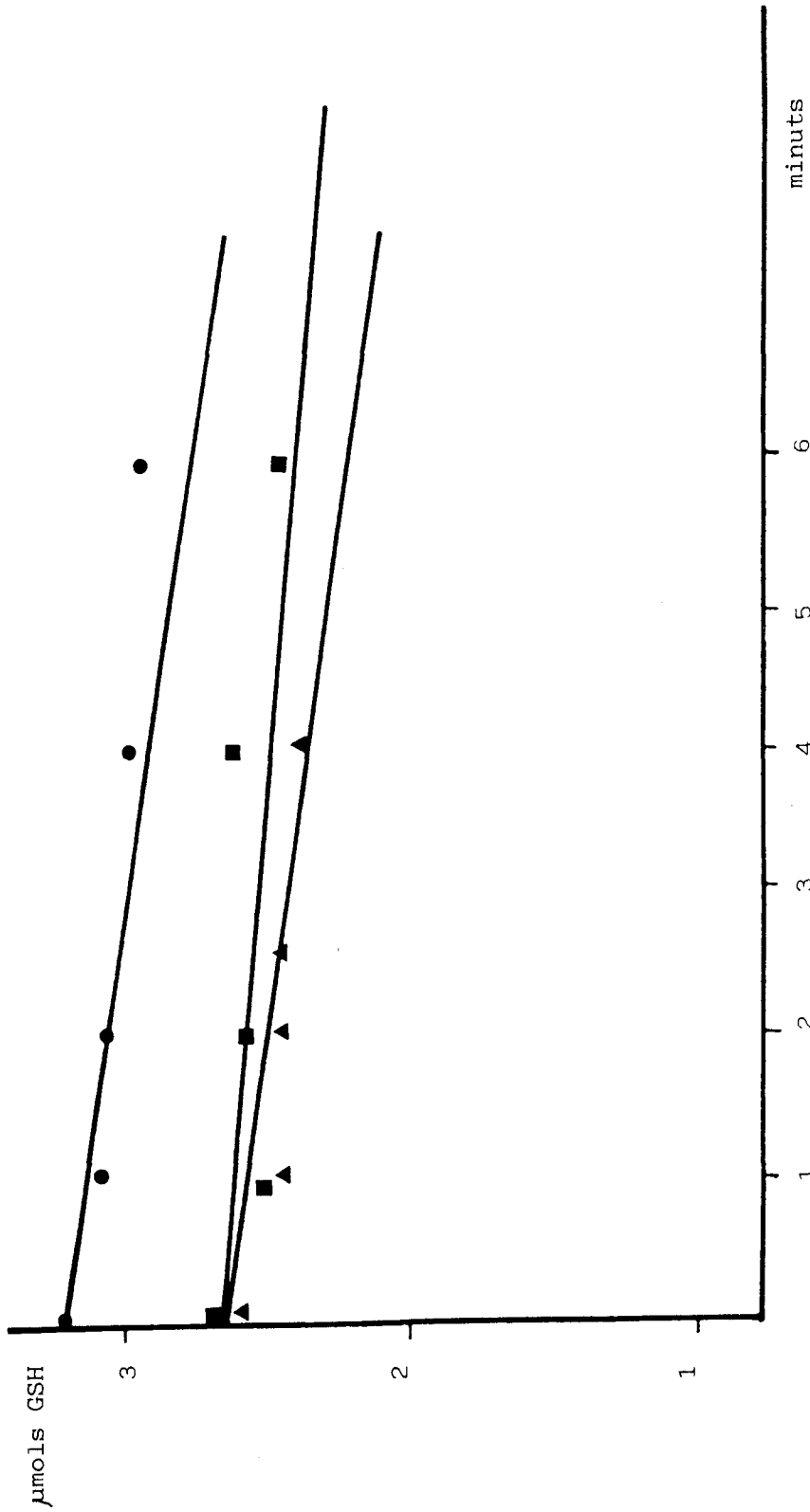


Fig. 16 - Formació de Tioèters a partir de l'alcohol alílic.
La fracció soluble de fetge de rata (0,5 ml FS \times O, 4mg de proteïna) s'ha incubat amb alcohol alílic (final 10 mM) i GSH (final 1 mM).
Cada gràfica representa una experiència individual.
L'activitat enzimàtica ve expressada en µmols de GSH consumits en la reacció.

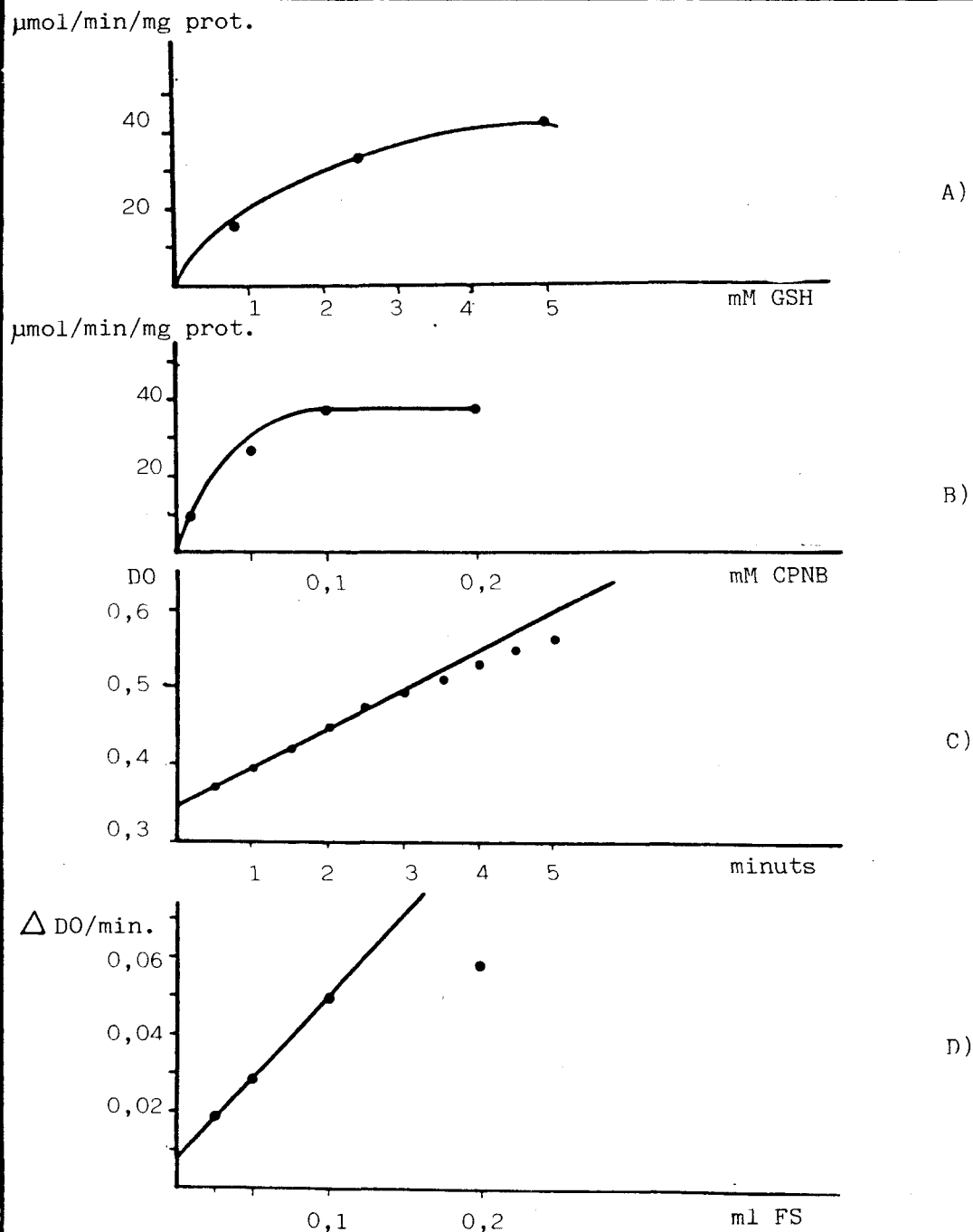


Fig. 17 - Formació de Tioèters a partir del CPNB.

La fracció soluble de fetge de rata s'ha incubat amb clorur de p-nitrobencil i GSH.

- A) μmols de tioèter formats per minut i per mg de proteïna en funció de la concentració de GSH en el medi (CPNB 0,1mM, FS 0,1ml).
- B) μmols de tioèter formars per minut i per mg de proteïna en funció de la concentració de CPNB. (GSH 5 mM, FS 0,1ml)
- C) Increment de la Densitat Optica a 310 nm en funció del temps. (CPNB 0,1mM, GSH 5mM, FS 0,1ml).
- D) Activitat de la GST en funció de la concentració de proteïnes. (CPNB 0,1mM, GSH 5mM, FS 0,1ml \approx 0,87 mg prot.)

I per acabar, en la Fig. 17D l'activitat enzimàtica GST s'estudia en funció de la concentració de proteïnes (CPNB=0,1mM, GSH=5mM) (0,1 ml. FS \approx 0,87 mg prot.).

De tot això es dedueix que les condicions òptimes per a les valoracions rutinàries de l'activitat GST seran:

GSH= a partir de 5 mM

CPNB= a partir de 0,1 mM

Temps de reacció= fins a 3 min.

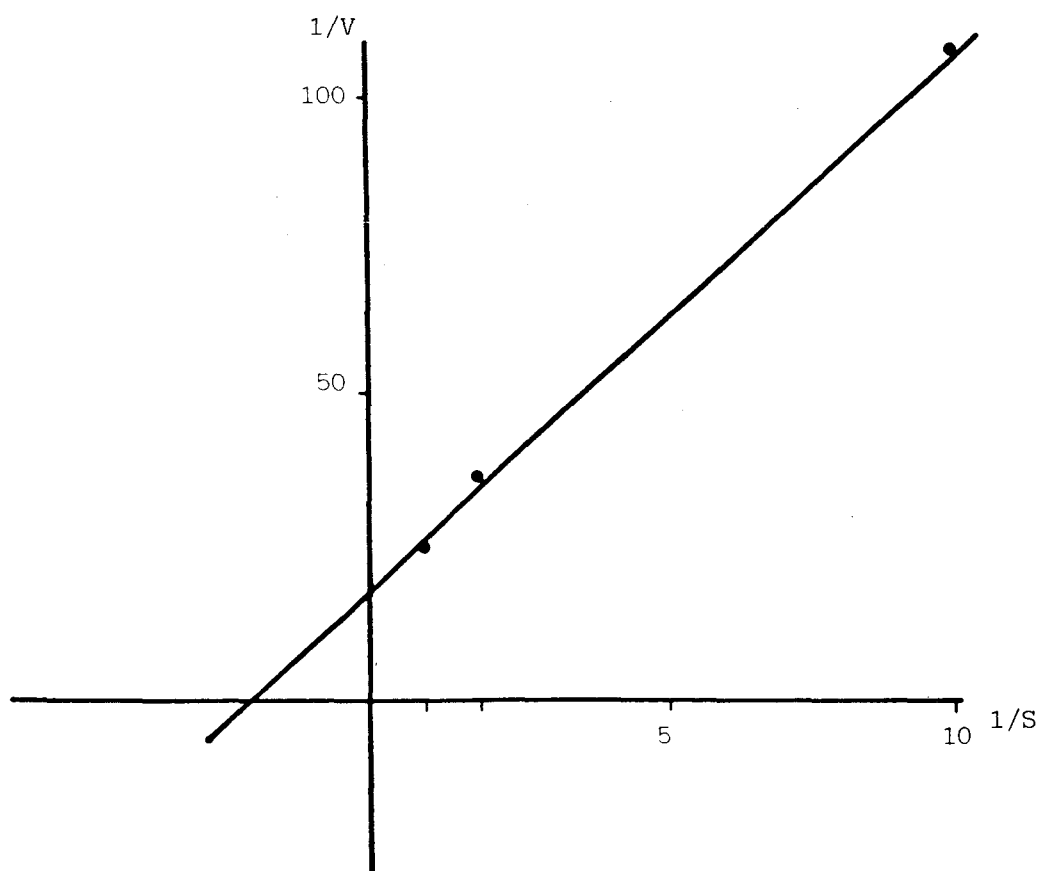
Concentració de proteïnes= entre 0,025 i 0,1 ml. de
FS nativa.

De les dades expressades a la Fig. 17B s'obtenen els valors de la K_m i $V_{m\grave{a}x}$.

A la Fig. 18 es pot veure una representació de Line-weaver-Burk d'aquests resultats.

La $V_{m\grave{a}x}$. = 0,066 mmols/min/mg prot.

La K_m = 0,090 x 10⁻³ M.



$V_{\max} = 0,066 \text{ mmols/min/mg prot.}$
 $K_m = 0,90 \times 10^{-4} \text{ M}$

Fig. 18 - Representació de Lineweaver-Burk , de les dades expressades a la Fig. 17B.
En abscises s'exposen els valors $1/S$, sent S la concentració mM del substrat.
En ordenades s'expressen els valors $1/v$, sent v la velocitat en mmols/min/mg proteïna.

2.3.2.- EFECTES DEL PER SOBRE L'ACTIVITAT GST DESPRÉS DE LA SEVA ADMINISTRACIÓ "IN VIVO" AL RATOLÍ.

A la Fig. 19 s'expressen els resultats de l'activitat enzimàtica de la GST hepàtica del ratolí, depenent de les dosis de PER administrades.

Podem observar com existeix una disminució d'aquesta activitat conforme s'incrementa l'administració del tòxic.

A la dosi de 0,3 ml de PER s'inhibeix més del 30 % de l'activitat enzimàtica. Dosis superiors provoquen ràpidament la mort de l'animal, pel que no es va poder realitzar una corba dosi/efecte adequada.

2.3.3.- EFECTES ENZIMÀTICS DEL PER "IN VITRO" SOBRE FETGE DE RATA.

Els resultats de l'activitat enzimàtica GST després de la incubació de la fracció soluble directament amb el PER, mitjançant agitació, es representa a la Fig.20.

Cada figura correspon als valors control i tractat, per cada animal estudiat. Com es pot observar existeix una disminució en aquesta activitat després de l'addició del tòxic. Aquesta inhibició oscil·la entre 28,5% i 54 %.

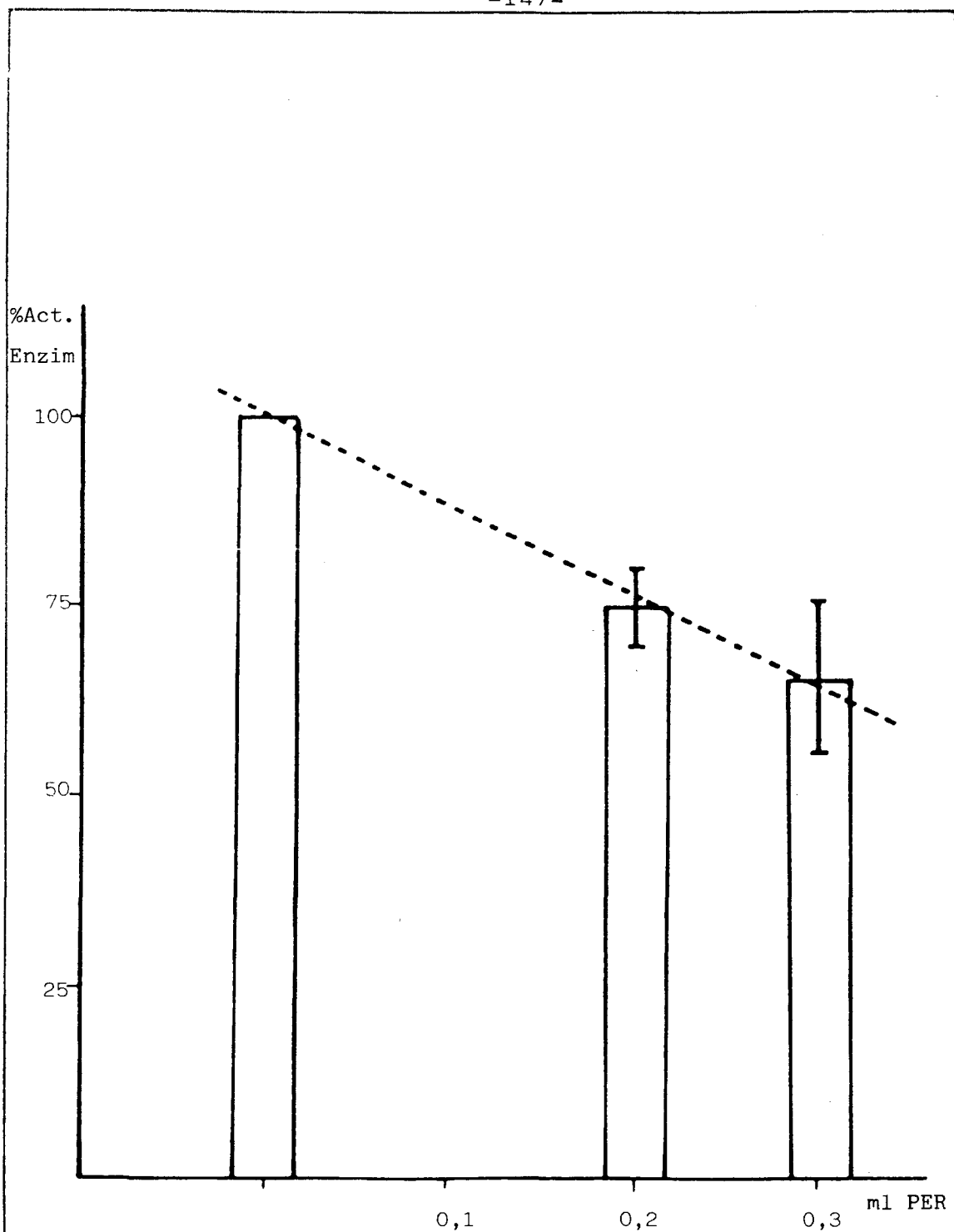


Fig. 19 - Activitat enzimàtica de la GST valorada emprant el CPNB com a substrat en ratolins tractats amb PER. En abscisses s'expressen les dosis de PER administrades. En ordenades el % d'activitat enzimàtica observat, prenent com a 100 % el valor calculat dels animals control no tractats. Cada valor és la mesura dels percentatges calculats sobre les dades d'activitat enzimàtica de cada cas.

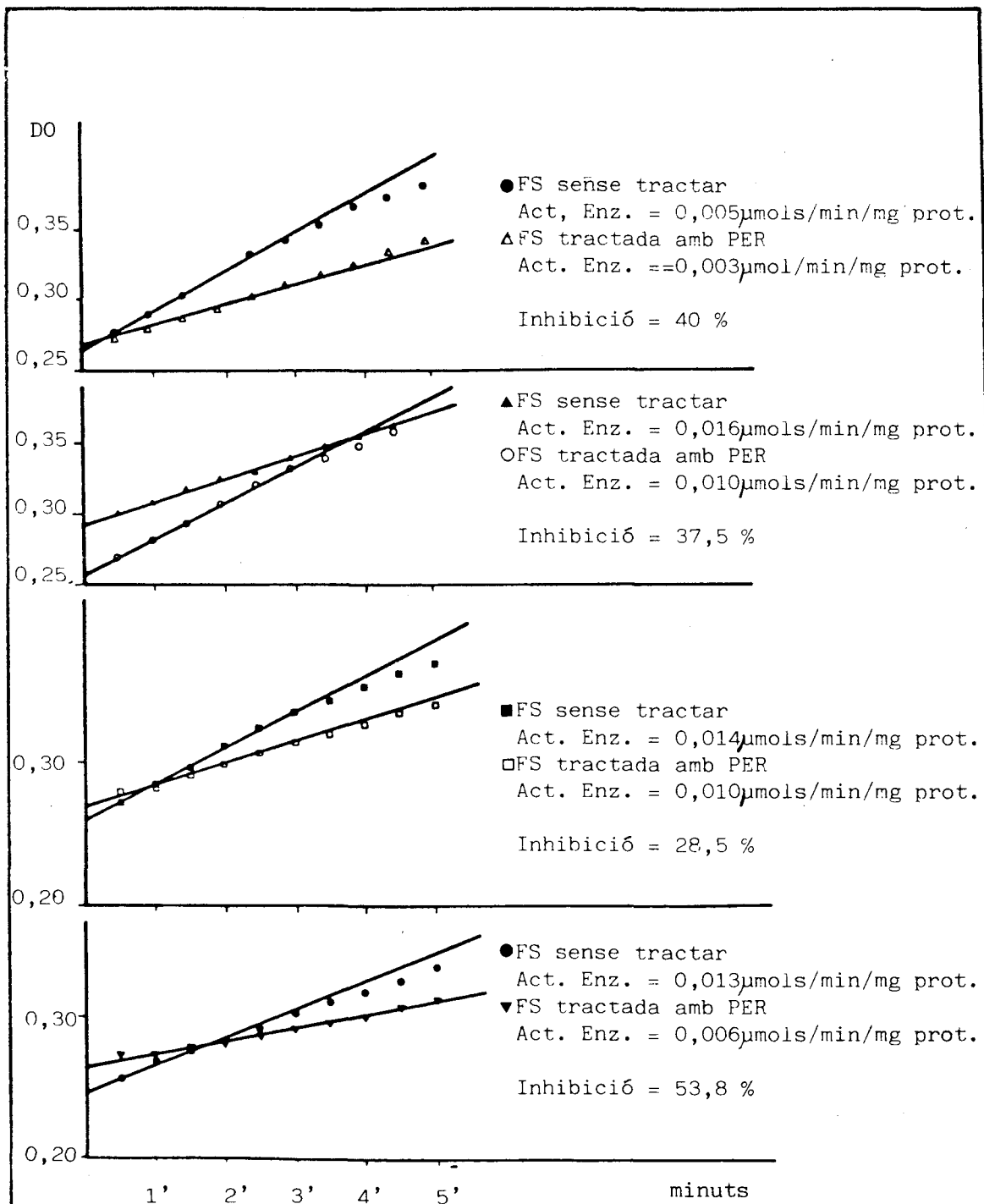


Fig. 20- Activitat enzimàtica de la Glutathion S-Transferasa, valorada emprant el CPNB com a substrat, després de la incubació de la fracció soluble directament amb el PER mitjançant agitació. GSH(5mM), CPNB(0,1mM), 0,1 ml FS(\approx 8mg/ml) En cada figura es representa l'activitat enzimàtica corresponent a un animal. Es comparen en cada cas els valors obtinguts en fracció soluble nativa i incubada amb PER.

Quan la incubació s'efectua solubilitzant prèviament el PER en etanol, els resultats són similars (Fig. 21).

Podem observar com després de la addició del PER, la corba d'activitat es desplaça, aplanant-se.

De les dades expressades a la Fig. 21, s'obtenen els valors de la K_m i $V_{m\grave{a}x}$. com queda reflexat en la Fig. 22, mitjançant una representació de Lineweaver-Burk.

Podem observar com $V_{m\grave{a}x}$. es manté igual en tots els casos i en canvi la K_m varia de 0,250 mM en el control a 0,5 mM per a una concentració de PER de 1,8mM i a 0,6 mM per a 2,28 mM de PER.

Això representa en el primer cas un increment del 85 % i en el segon del 122 %. De totes les experiències realitzades fins el moment s'obté un valor mitjà de $V_{m\grave{a}x}$. = 0,078 mmol/min/mg prot., una K_m (control) = 0,250 x 10⁻³ M, una K_m (PER 1,8 mM) = 0,39x10⁻³M i K_m (PER 2,28 mM) = 0,42 x 10⁻³M.

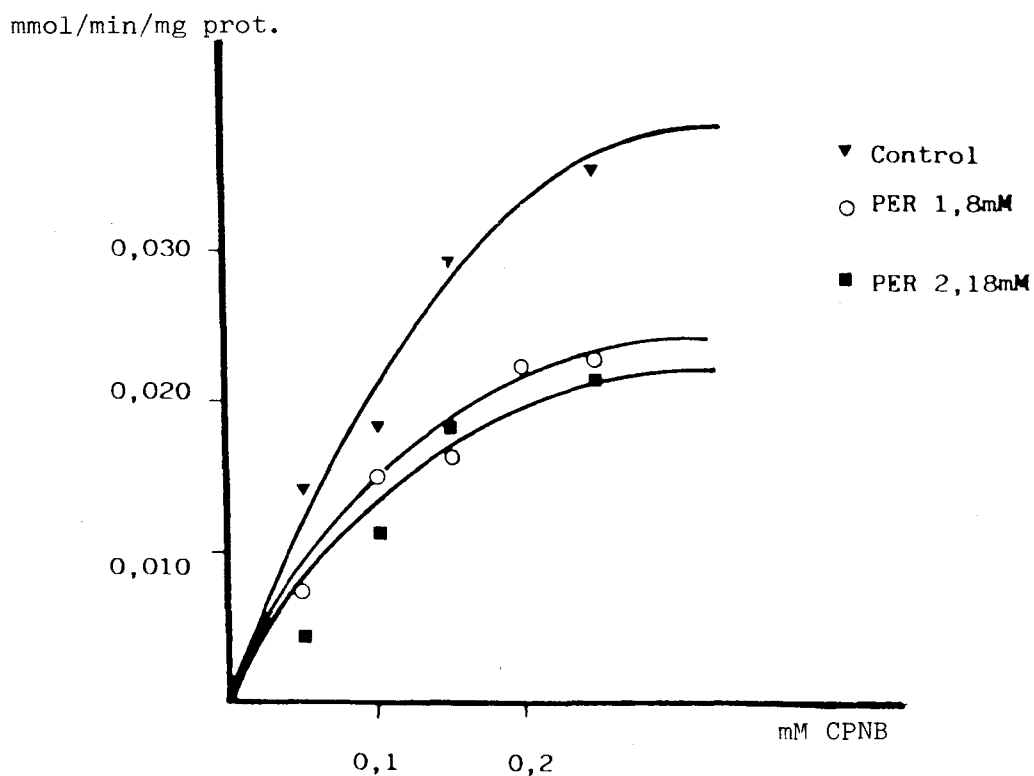
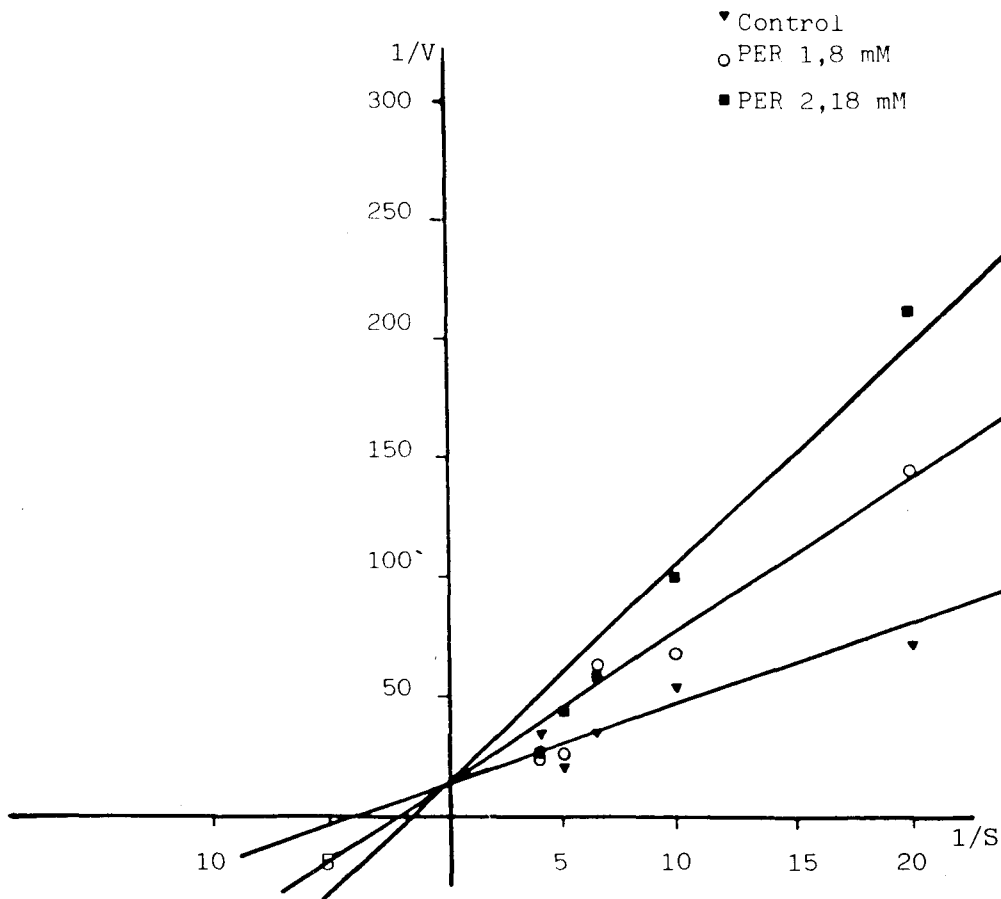


Fig.21- Activitat enzimàtica de la GST a diferents concentracions de CPNB i en diferents condicions:
-"basals"
-en presència de PER 1,8 mM
-en presència de PER 2,18 mM
GSH (final 5 mM) FS 0,05ml(=0,4 mg prot.)
Aquesta activitat ens ve donada en mmols/min/mg proteïnes.



$V_{max.} = 0,066 \text{ mmols/min/mg prot}$
 $K_m \text{ Control} = 2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$
 $K_m \text{ PER } 1,8 \text{ mM} = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$
 $K_m \text{ PER } 2,18 \text{ mM} = 6 \times 10^{-4} \text{ M}$

Fig. 22- Representació de Lineweaver-Burk , de les dades expressades a la Fig. 21A.
En abscisses s'exposen els valors 1/S, sent S la concentració mM del substrat.
En ordenades s'expressen els valors de 1/v, sent v la velocitat en mmoles/min/mg proteïna.

3.- ESTUDI SOBRE L'EXPOSICIÓ LABORAL ALS ASFALTS.

3.1.- MOSTRATGE INICIAL.

Els resultats obtinguts es reflexen a la Fig. 23 A.

Com es pot veure, existeix una clara disminució de TU al llarg de la setmana en tots els casos estudiats. Aquest descens va precedit d'un augment de l'eliminació de TU en els primers dies de la setmana.

De les dades experimentals pot calcular-se la cinètica d'eliminació d'aquests metabòlits mitjançant la representació semilogarítmica dels resultats. En efecte, prenent tots els punts de la fase de descens pot calcular-se (Fig. 23 B) el valor de $t_{1/2}$ per cada subjecte estudiat. Aquests valors oscilen entre 0,45 i 6,5 dies, sent la mitjana de 2,78 dies.

3.2.- ESTUDI INDIVIDUALITZAT A LLARG TERMINI

La Fig. 24 mostra les xifres de Tioèters urinaris d'un individu al llarg d'un període de tres setmanes. Les dues primeres setmanes foren normals quant a treball en contacte amb l'asfalt; durant la darrera setmana aquest contacte no es va donar.

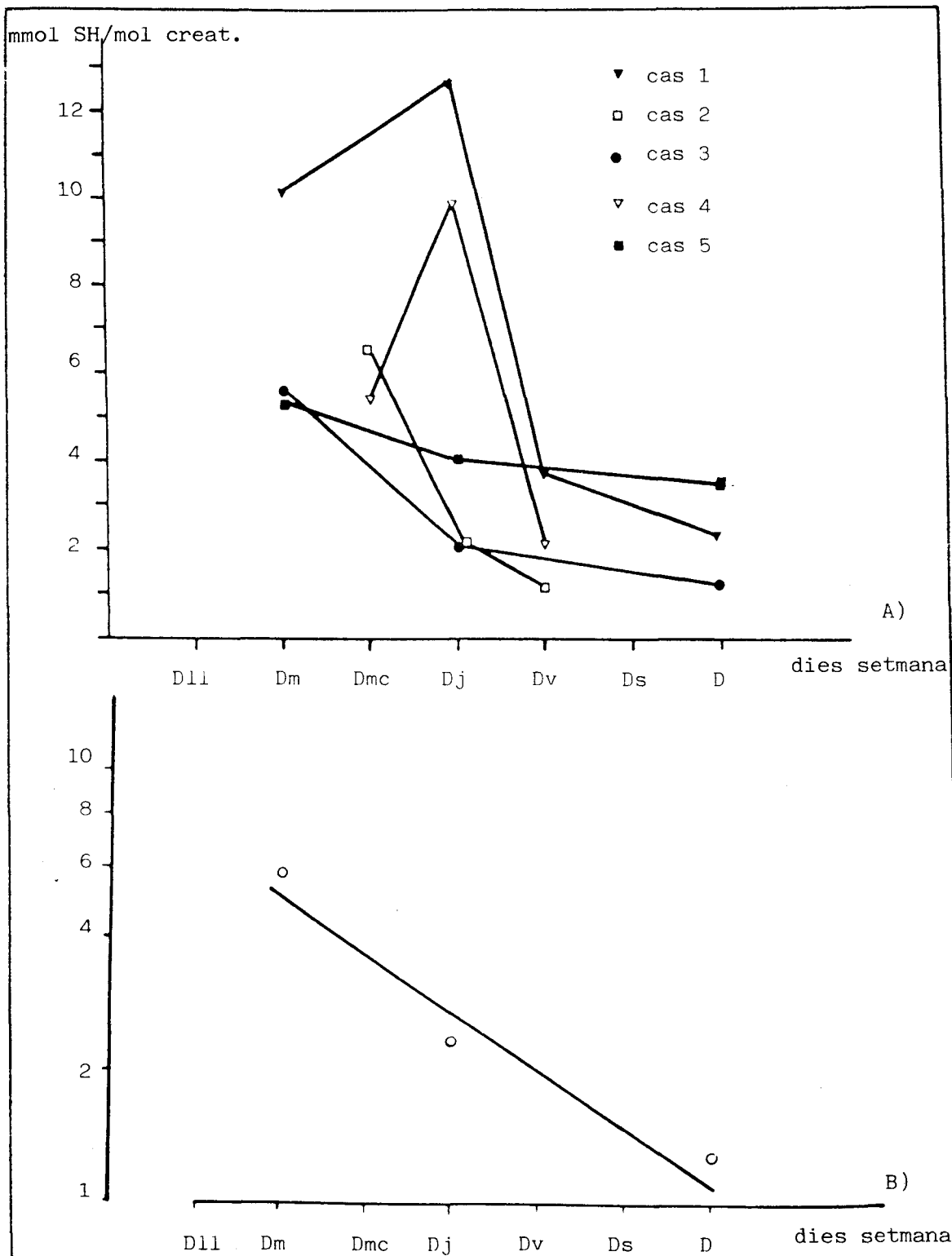


Fig.23 A- Tioèters urinaris en els 5 casos estudiats, al llarg d'una setmana en exposició laboral a l'asfalt. Les unitats de TU s'expressen en mmols de SH/mol de creatinina.

Fig.23 B- Representació semilogarítmica dels punts de la fase de descens de la Fig. 23 A.

En aquest cas, podem observar com en la segona meitat de la setmana, els valors de TU disminueixen, arribant a valors mínims els dies festius. És a dir, es repeteix el perfil d'eliminació d'aquests metabòlits, observat ja en l'anterior estudi.

Podem veure també, com en la darrera setmana, durant la qual el treballador no va estar en contacte amb l'asfalt, les xifres de TU es mantenen pràcticament constants.

4.- ESTUDI SOBRE L'EXPOSICIÓ AL FUM DEL TABAC.

4.1.- ESTUDI GENERAL D'INDIVIDUS FUMADORS I NO FUMADORS.

En la Fig. 25 es presenten els resultats obtinguts en individus fumadors i no fumadors. La mostra de fumadors es va dividir en tres grups segons la intensitat de l'hàbit tabàquic (com ja referim en el Material i Mètodes). Les concentracions de Tioèters urinaris obtinguts, es representen mitjançant una distribució de freqüències, en mmols de SH/mol de creatinina.

El detall més significatiu d'aquests resultats és la progressiva desviació a la dreta dels valors a mesura que augmenta el consum de tabac.

Aplicant una anàlisi de la variància entre aquests grups obtenim diferències significatives amb una $p = 0,0004$ (Test de Bartlett d'Homogeneïtat de Variància positiu).

Posteriorment es porta a terme la prova de contrastos de Scheffé, obtenint-se diferències significatives entre tots els grups ($p < 0,05$).

4.2.- ESTUDI INDIVIDUALITZAT EN LA PROGRESSIÓ CONTROLADA DE L'HÀBIT TABÀQUIC.

En la Fig. 26 es representen els valors de TU obtinguts al llarg de l'experiència al mateix temps que el perfil del consum de cigarretes. En ella s'observa cla-

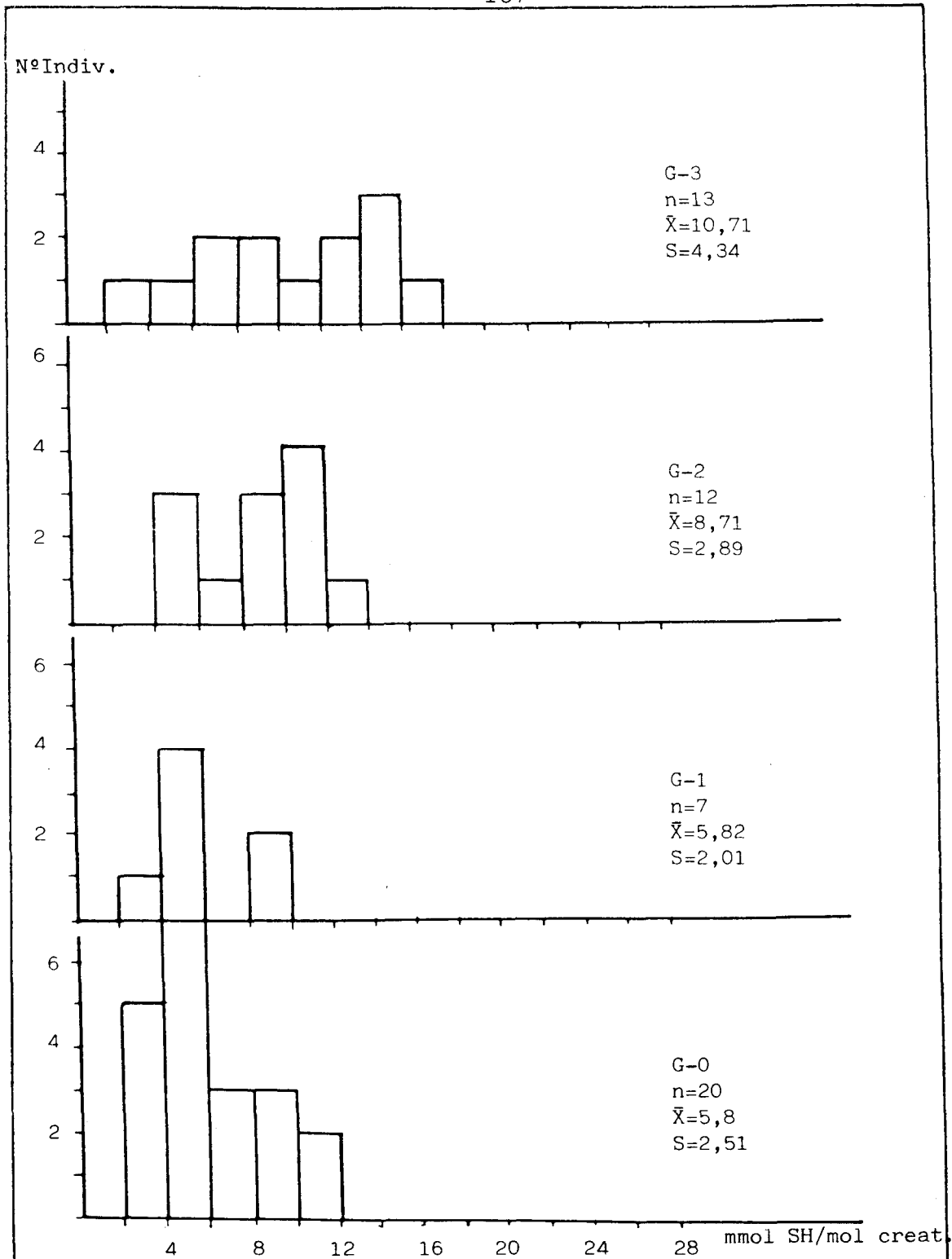
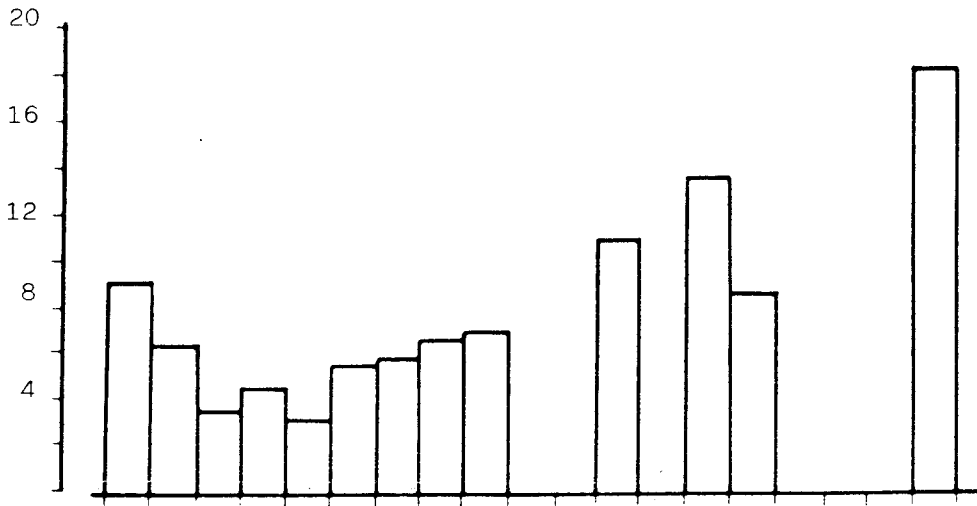


Fig. 25- Histograma de la distribució de freqüències dels valors de TU en la població de no fumadors (G-0) i en els diferents subgrups de fumadors segons el consum de tabac: de 1 a 10 c/dia (G-1, de 10 a 20 c/dia (G-2) i més de 20c/dia (G-3). Els valors de TU venen expressats en mmols SH/mol creatinina.

mmol SH/mol creat



cigarretes/dia

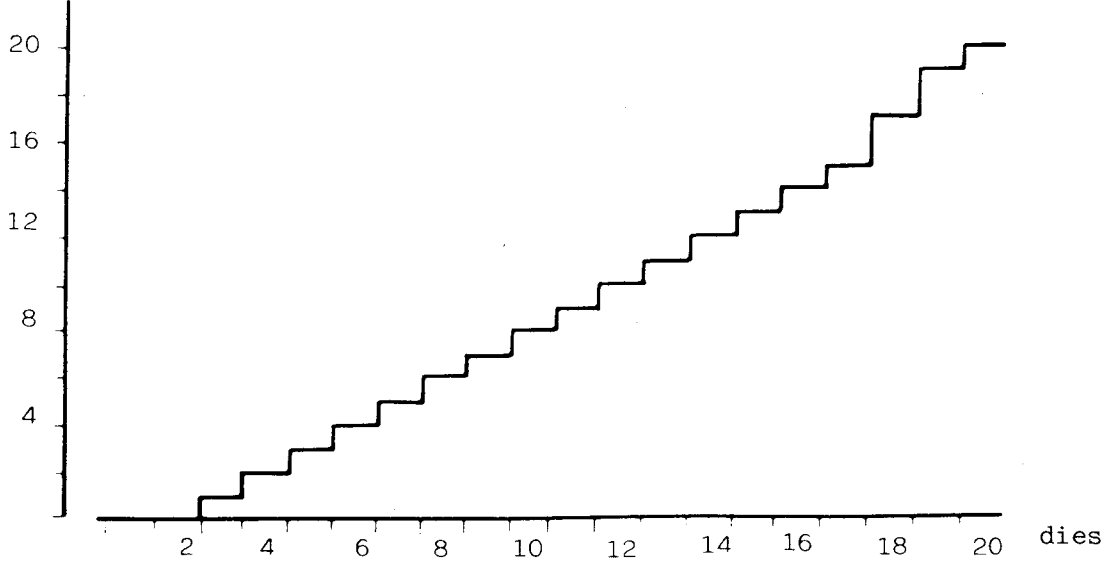


Fig. 26- A la part superior de la Figura es representen les xifres de TU obtingudes en l'estudi de la progressió controlada de l'hàbit tabàquic. A la part inferior de la Figura, es pot veure l'esquema del consum de cigarretes.

rament que les xifres de TU augmenten paral·lelament al consum de tabac.

Així mateix es fa palès el desfasament de dos dies entre la interrupció de l'hàbit tabàquic i la normalització a xifres basals dels TU.

4.3.- ESTUDI COMPARATIU ENTRE FUMADORS DE TABAC "NORMAL" I "BAIX EN QUITRÀ".

En l'estudi comparatiu, s'obtingueren resultats vàlids (creatinines superiors a 5 mmol/l) en la majoria de mostres d'orina recollides al llarg de la setmana; per tant, de cada classe i tipus de tabac i per cada individu, s'obtingueren uns valors mitjans d'almenys quatre determinacions (Fig. 27).

Els valors de TU observats en aquest estudi comparatiu es corresponen perfectament amb aquells del grup de fumadors control.

Per a interpretar estadísticament aquests resultats es va dissenyar una anàlisi multifactorial de la variància amb dos factors (TIPUS DE TABAC/INDIVIDU), amb la finalitat d'augmentar la potència de la prova (test de Bartlett d'Homogeneïtat de Variància positiu).

Per aplicar aquesta anàlisi estadística és necessari eliminar el cas nº 2 ja que no es va portar a terme l'experiència completa.

mmol SH/mol creat.

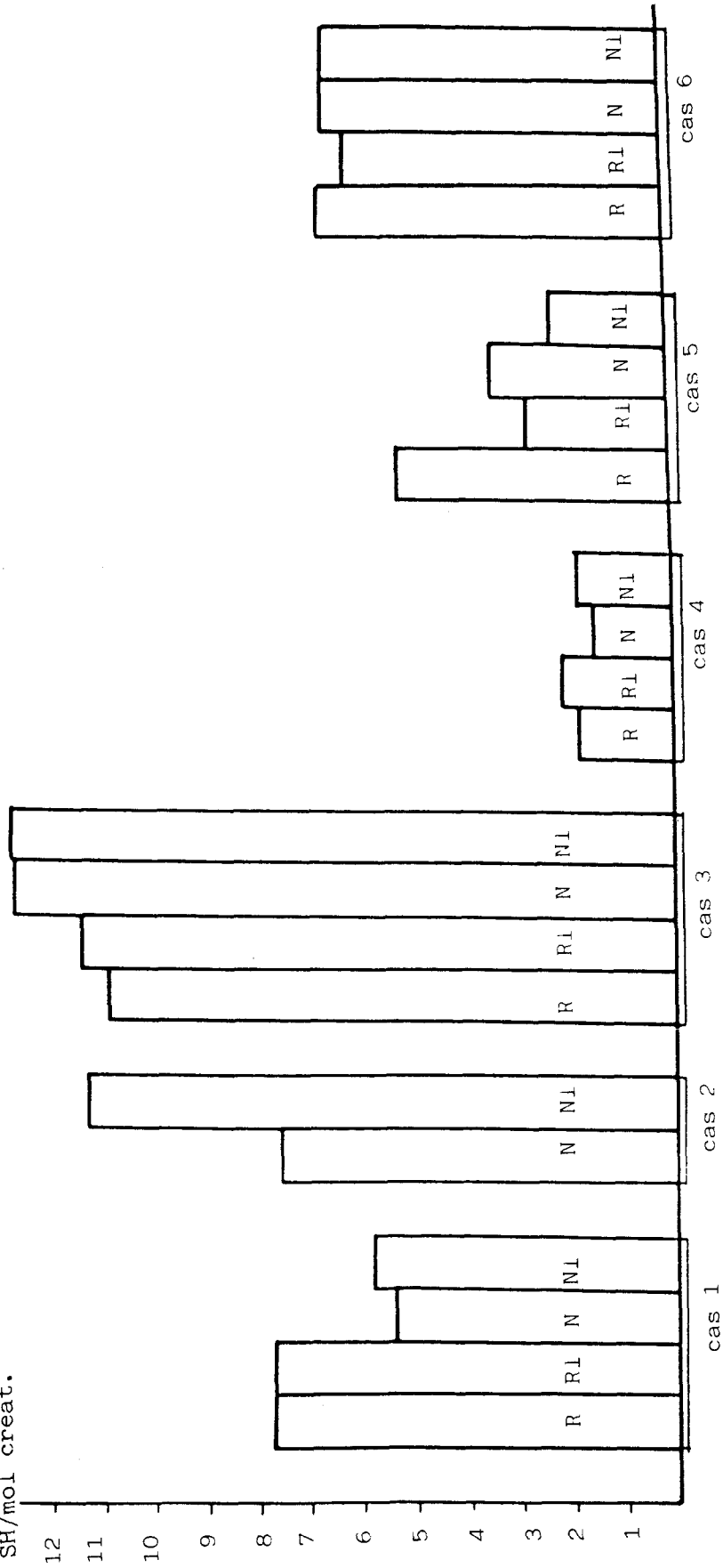


Fig. 27- Distribució dels valors de TU en els diferents individus estudiats, i segons el tipus de tabac consumit Ros (R), Ros "lighth" (RL), Negre (N) i Negre "lighth" (NL). Cada valor expressat correspon a la mitjana d'almenys quatre determinacions. Els TU venen expressats en mmols SH/mol creatinina.

- Quant al primer factor, TIPUS DE TABAC, no es demostren diferències significatives entre els diferents tipus i formes de cigarretes estudiades.
- Respecte al segon factor, INDIVIDU, si existeixen diferències significatives entre els subjectes que participen en l'experiment, com ja podia esperar-se donada al gran variabilitat personal ($p < 0,01$).
- Quant a les possibles interaccions entre ambdós factors, no existeixen tampoc diferències significatives.

DISCUSSIO

DISCUSSIÓ

1.- UTILITAT DE LA DETERMINACIÓ DE TIOÈTERS URINARIS COM A INDICADOR BIOLÒGIC.

La farmacogenètica contribueix al més gran coneixement de les característiques individuals dels processos de biotransformació especialment dels productes estranys. Aquestes característiques condicionaran la capacitat d'eliminació de nombrosos compostos que necessiten prèviament ser biotransformats.

Actualment l'estudi dels processos de metabolització tenen una gran utilitat en clínica tant per a prevenir efectes no desitjats dels fàrmacs com per a precisar pautes terapèutiques específiques. No obstant l'interès del coneixement d'aquests processos de biotransformació, va més enllà de la simple utilitat terapèutica, ja que, com ja hem parlat en aquesta tesi, té també una gran aplicació en el terreny de la toxicologia.

Com ja hem vist, de tots els sistemes enzimàtics implicats en la metabolització dels xenobiòtics són d'especial interès:

- a) Els processos oxidatius.
- b) Els processos de conjugació.

Generalment els processos oxidatius són el primer pas dels processos de biotransformació per a facilitar a continuació les reaccions de conjugació. Aquestes reaccions oxidatives tenen un especial interès ja que molts dels

productes derivats d'elles són altament reactius i poden constituir un seriós perill per a l'organisme al marge dels beneficis que poden comportar.

Hem vist també com entre els sistemes de conjugació el sistema GSH-GST és especialment eficaç per a neutralitzar els derivats electrofílics, ja siguin procedents directament de l'exterior, o bé els originats per processos oxidatius com abans esmentàvem.

En aquesta tesi hem centrat el nostre interès en l'estudi de la biotransformació d'aquests compostos electrofílics a través de la seva conjugació amb el GSH i la seva posterior eliminació en forma de TU.

Som conscients de què els TU representen només una part dels mecanismes de detoxificació i que, en tot cas, un estudi més profund del tema requeriria valorar les característiques enzimàtiques de les GST així com altres sistemes enzimàtics implicats.

Naturalment tot això escapa dels límits del nostre treball i per altra banda l'interès de la determinació dels TU, radica precisament en la seva inespecificitat, senzillesa i baix cost.

Per a interpretar la significació biològica dels TU, s'ha de tenir en compte una sèrie de factors involucrats d'una manera o altra en la seva formació: per una banda hem de tenir en compte els nivells de GSH dins l'organisme; aquest dependrà, com ja sabem de les característiques individuals i d'altres factors (etanol, dieta, etc.). El GSH pot ser també depleccionat en intoxica-

cions agudes i puntuals com ja anteriorment hem descrit (116). Igualment les Glutation S-Transferases dependran de les característiques genètiques i també de les adquirides (hàbit dietètic (11,153), alcohòlic (80,121), etc.) tenint sempre en compte a més les possibles induccions o inhibicions d'aquests enzims per agents interferidors.

Per altra banda, una excessiva inducció del citocrom P450, augmentarà els processos oxidatius, resultant en un increment dels compostos electrofílics endògens, amb el conseqüent augment dels TU.

Deixant de banda tots aquests factors que intervenen directament sobre els sistemes enzimàtics de biotransformació, hem de tenir en compte també que la producció de TU ve donada fundamentalment per una exposició a agents electrofílics, ja sigui el propi tabac com s'ha descrit en aquestes pàgines, o provinents d'altres ambients com pot ser el laboral o el propi d'una àrea con-taminada en la seva atmosfera.

De tot això es dedueix que els factors de tipus individual marquen preferencialment el que ja hem definit com a CONTAMINACIÓ INTERNA.

Com a conseqüència no necessàriament ha d'existir una perfecta correlació entre l'exposició a aquests compostos electrofílics i els nivells de TU. És a dir, a igualtat d'exposició ens podem trobar nivells de TU elevats per un o més d'un dels següents factors:

- gran activitat dels sistemes enzimàtics oxidatius,
- gran activitat de la GST,
- nivells de GSH elevats,

- coexistència amb certs hàbits (tabac, etilisme) i algunes dietes (antioxidants).

Contràriament, xifres de TU disminuïdes ens indicaran:

- disminució de l'activitat enzimàtica dels sistemes oxidatius,
- disminució de l'activitat enzimàtica de la GST,
- nivells de GSH insuficients,
- presència concomitant d'inhibidors de les GST.

Veïem, doncs, com pot existir una gran variabilitat individual que proporcionarà una resposta global diferenta davant de cada tòxic i cada individu.

Per tant, per superar aquests inconvenients i poder interpretar el sentit dels valors alts de TU en una població determinada i en relació a una altra no exposada, és necessari realitzar un nombre d'observacions considerable, en el cas de que l'estudi parteixi d'una sola mostra d'orina per individu.

Com desgraciadament aquest no és el cas en general, ja que és difícil trobar suficient nombre de persones que es prestin voluntàries, la realització de l'assaig amb una sola mostra d'orina no sol ser suficientment sensible.

Per això és de gran utilitat, quan es disposa de pocs casos, realitzar un assaig seqüencial comparant els valors de TU durant varis dies del període d'exposició i de no exposició. Amb això s'eviten les interferències interindividuais i es té una imatge més completa de l'evo-

lució personal en aquestes circumstàncies. Per altra banda es obvi que ni molt menys tots els xenobiòtics s'eliminen en forma de TU; ni tampoc que tots els compostos electrofílics són capaços de biotransformació amb la mateixa intensitat a TU.

Així, per exemple, en el treball de Van Doorn i cols. sobre l'exposició al Clorur de metil (161) no s'obtingueren diferències significatives amb el grup control quant als TU i tantmateix el metabòlit pot posar-se de manifest emprant tècniques cromatogràfiques específiques.

Moltes vegades els TU representen una via d'aproximació per als estudis d'intoxicació ambiental, professional, o de Salut Pública, ja que permeten, d'una manera ràpida i senzilla, establir la presència de concentracions ambientals de certs tòxics que poden incidir sobre la població.

A més, gràcies a aquest assaig podem determinar grups de risc elevat entre aquells individus amb baixa capacitat de formació de TU.

En aquest sentit hem de dir que no s'ha demostrat encara aquesta relació entre xifres de TU disminuïdes en una exposició a aquests compostos electrofílics, i una més gran vulnerabilitat en front d'ells.

Tantmateix, és lògic fer aquesta relació ja que aquest fet de vulnerabilitat al tòxic sí s'ha manifestat en els passos previs, és a dir, quan existeix una deplecció del GSH o una inhibició de la GST.

Kilpikari (98) comenta aquest fet en el seu estudi sobre l'exposició al cautxú de treballadors acabats d'incorporar a la planta, i posa sobre avís del perill que evidencien les xifres baixes de TU.

Igualment Van Doorn i cols. (162) en un treball realitzat en rata tractada amb xilè i toluè, observen aquestes xifres disminuïdes de TU, després d'un període de gran eliminació d'aquests metabòlits, i suggereixen que aquestes xifres baixes demostrarien un esgotament del GSH amb l'evident risc d'intoxicació que això comportaria.

Per tant, i amb totes les seves limitacions, la determinació de TU ha de ser de gran utilitat per a controlar diversos quadres d'intoxicació en àmbits de probable contaminació ambiental, ja siguin laborals o no, no tant sols pels avantatges que aporta la tècnica sinó perquè en molts casos pot ser el punt de partida d'estudis més selectius com l'anàlisi de la capacitat mutagènica d'aquestes orines, o l'anàlisi de metabòlits urinaris, procedents d'un tòxic concret (24-26,39).

2.- DISCUSIÓ DE LA METODOLOGIA.

2.1.- QUANT A LA DETERMINACIÓ DELS TU.

La determinació de TU és un mètode inespecífic que únicament posa de manifest l'existència de la funció tioèter que, després de la hidròlisi, exhibeix els grups SH. Per tant, no ens informa de la naturalesa química del tòxic o del seu metabòlit, cosa que requerirà un estudi més profund i més concret.

En general, els TU es poden abordar de dues maneres:

- 1) Realitzant una hidròlisi directa de tots els TU.
- 2) La hidròlisi es realitza en els TU resultants d'una prèvia purificació que pretengui eliminar fonamentalment la cistina present en l'orina.

En el primer cas la determinació de TU serà completa, encara que s'afegiran les grans variacions interindividuals degudes a la presència dels disulfurs endògens com la cistina. En el segon cas, eliminant la contaminació d'aquests disulfurs endògens, correm el risc d'obtenir recuperacions escasses de la quantitat total de TU en l'orina.

En un primer moment podríem pensar en determinar la cistina urinària en les mostres per a posteriorment restar-la del resultat final. Actualment la cistina es pot determinar per tres mètodes. Alguns autors reconeixen la utilització de l'autoanalitzador d'aminoàcids (7,62, 102,112,154). Altres prefereixen treballar amb isòtops

radiactius (43,58,111) o bé amb el mètode basat en la utilització de la proteïna específica fixador de cistina, d'Escherichia Coli (46,92,93,132,158).

Així i tot, tots aquests mètodes són d'un nivell tècnic elevat que encariria molt la determinació de TU, i la desposseiria d'una dels seus principals avantatges: la del seu baix cost econòmic.

El grup finlandès de Vainio i cols., han publicat diversos treballs determinant els TU directament per hidròlisi, per a la qual cosa els és precís emprar mostres de gran mida per eliminar les variacions interindividuals.

El grup holandès d'investigadors de Van Doorn i cols., prefereix tantmateix, emprar una prèvia extracció de l'orina, abans de portar a terme la determinació de TU.

Nosaltres, en aquesta tesi, ens hem decantat per la utilització d'aquesta darrera tècnica, emprant l'acetat d'etil com agent extractor a un pH àcid, amb la qual cosa s'aconsegueix eliminar la cistina endògena, i per tant, les variacions interindividuals que això comporta. L'aplicació d'aquest mètode permet doncs treballar amb una grandària de mostres més reduïda, encara que presenta l'inconvenient de què podem perdre una certa quantitat de TU no extraïbles per l'acetat d'etil. En aquest sentit dependrà de la naturalesa química del metabòlit eliminat, el que la seva recuperació en la fase d'extracció sigui més o menys gran.

Malgrat aquests inconvenients el mètode emprat per Van Doorn i cols., és el més utilitzat en l'actualitat

i nosaltres el considerem particularment idoni per a formats de mostres reduïdes.

2.2.- QUANT A LA DETERMINACIÓ DE LA CREATININA URINÀRIA.

Encara que en un principi s'utilitzà un autoanalitzador per a la determinació d'aquest paràmetre, creiem que aquest tipus d'aparell permet un marge d'error massa elevat pels petits canvis que pretenem observar en l'eliminació dels TU. Per això decidirem determinar les creatinines en el nostre laboratori, mitjançant "kits" comercials amb els que s'aconseguí una més gran homogeneïtat dels resultats.

En aquest sentit també hem pogut observar que les orines amb escassa quantitat de creatinina, presenten xifres de TU anormalment elevades. Per això hem procedit a eliminar sistemàticament els resultats corresponents a orines amb xifres de creatinina inferiors a 5 mmols/l. Aquest criteri també ha sigut descrit pels autors holandesos Van Doorn i cols., en el seu treball portat a terme amb els operaris d'una planta incineradora de residus químics l'any 1981 (165). En ell es detallen els valors de creatinina recomanables, que són sempre superiors als valors abans esmentats.

2.3.- QUANT A LA RECOLLIDA DE LES MOSTRES D'ORINA.

S'ha pogut observar en aquesta tesi, que les determinacions de TU s'han portat a terme en una sola mostra d'orina per dia i no com semblava ser més correcte, en orina de 24 hores. Tantmateix hem de pensar que la determinació de creatinina urinària es fa precisament per compensar les possibles variacions de concentració urinària al llarg del dia.

Es considera que l'eliminació de la creatinina és constant i té, per tant, una funció correctora en el moment d'expressar els resultats en xifres reals.

Per altra banda, l'eliminació d'aquests compostos originàriament de característiques lipòfiles, fa que la seva metabolització sigui suficientment lenta com perquè en la majoria de casos existeixi un decalatge en la seva eliminació de varis dies, i que aquesta sigui més o menys uniforme durant la jornada. Per tant, ens és fins a cert punt indiferent, l'escollir una hora determinada per a la recollida de la mostra, i aquesta s'ha determinat per a cada tipus d'experiència a fi d'obtenir la màxima col.laboració de la persona voluntària.

Nosaltres som conscients de que seria molt més precís determinar els TU en orina de 24 hores, encara que existeixen grans dificultats tècniques a l'hora de posar-ho en pràctica (pensem, per exemple, en les dificultats que suposaria a un dels voluntaris el fet de recollir l'orina al seu lloc de treball).

Expressió de totes aquestes dificultats seria el fet de que tots els treballs publicats fins el moment sobre aquest tema, s'han realitzat amb tant sols una mostra d'orina.

2.4.- QUANT AL DISSENY EXPERIMENTAL

Com s'ha vist en aquesta tesi, existeixen dos tipus fonamentals de disseny experimental, condicionats a la mida de la mostra.

En els estudis en els que es compta amb un gran nombre de casos, es treballa amb una sola mostra d'orina per a cada cas i dia, escollint llavors el moment de màxima exposició.

Contràriament, quan es compta amb un nombre limitat de casos, s'opta per la fórmula de l'estudi continuat d'un mateix individu, obtenint d'ell vàries mostres d'orina de diferents dies, incluint entre ells un o varis dies de no exposició. Amb això, obtenim un perfil d'eliminació per a cada individu, sent ell mateix el seu propi control.

Ambdós mètodes pretenen evitar així, cadascun d'una forma diferenta, el problema de les variacions interindividuais.

3.- DISCUSIÓ DELS RESULTATS.

3.1.- SOBRE L'EXPOSICIÓ A LA CONTAMINACIÓ AMBIENTAL.

Els resultats d'aquest estudi s'han analitzat des de dos punts de vista.

En el primer, es relacionen els nivells de TU i l'exposició a un ambient industrialitzat; i en el segon, la relació entre els esmentats TU i la convivència amb familiars fumadors i no fumadors. Per això, s'ha efectuat una anàlisi de la variància de dos factors, com ja hem vist en el capítol de Resultats, agrupant per una banda les quatre poblacions considerades com a contaminades, i per l'altra, les no contaminades, considerant-les mostres homogènies (tres de les poblacions posseïen un nombre de mostres molt reduït al ser nuclis rurals molt petits).

A més, es tornen a agrupar tenint en compte l'hàbit tabàquic dels pares.

Els valors de TU del grup de poblacions a les que hem nomenat Contaminades, oscil·laven de 1 a 8 mmols SH/mol creat. i els de les Contaminades de 2 a 10 mmols SH/mol creat.

Aquesta anàlisi de la variància multifactorial amb repeticions ens permet, a més, estudiar les possibles interaccions entre ambdós factors. Recordem que en

aquest cas, i per al factor Contaminació, ^{ni ha d'è}
rències significatives entre els dos grups estudiats pe-
rò no per a l'altre factor ni per a possibles interac-
cions entre ambdós factors.

L'anàlisi dels TU no és un mètode específic per a
tots els tòxics ambientals, i una part important dels
mateixos escapa segurament al nostre control.

En la població que considerem com a contaminada, la
xifra de TU obtinguda és baixa si la comparem amb els
nostres valors control de no fumadors en l'estudi sobre
el tabaquisme, que veurem més endavant. Si acceptem com
a bons aquests valors control podriem dir que els valors
de TU d'aquesta població exposada, està dins dels límits
normals i que en tot cas l'hipotètic grau de Contamina-
ció Ambiental del nostre estudi no seria suficientment
alt com per augmentar l'eliminació dels TU. Per tant,
aquesta determinació no seria prou fiable en un estudi
no comparatiu dels efectes de la Contaminació Ambiental.

Per altra banda no s'ha d'oblidar que les condicions
metereològiques incideixen d'una forma important en el
grau de Contaminació. Per tant, creiem que estudis
d'aquest tipus han de ser portats a terme vèries vega-
des al llarg de l'any, sota diferents condicions mete-
reològiques, per a poder treure conclusions més fiables.
En el nostre cas, recordem que l'estudi va ser realitzat
en el mes de juny, en un període de calma de vents que
facilitaria la permanència dels agents contaminants. Això
no obstant, l'esmentada època de l'any no és propensa a
mantenir una situació de Contaminació Ambiental que se-
ria més favorable en l'època freda (gener, febrer), quan

es propiciarien les situacions d'inversió tèrmica.

En conclusió direm que l'existència de diferències significatives entre poblacions Contaminades i no Contaminades fa pensar que existeixen realment concentracions de compostos electrofíllics més elevades en unes que en les altres i seriam partidaris de completar la determinació de TU amb un altre test com és el de mutàgens en orina.

Així doncs, l'anàlisi de TU seria el mètode d'aproximació ràpid i senzill que manifestaria els grups de risc i el test de mutàgens seria el mètode específic que demostraria realment aquesta toxicitat ambiental i els seus evidents riscos.

Per altra banda, els resultats demostren la no existència de diferències significatives entre els nens, els familiars dels quals eren fumadors i els que no ho eren. S'ha demostrat que el fumador passiu té nicotina en sang i cotinina (metabòlit de la nicotina) en orina, encara que en quantitats molt inferiors a les del fumador actiu (57). No s'ha descrit encara si respecte als TU passa el mateix. En el nostre cas, l'absència de diferències entre ambdós grups de nens pot interpretar-se com una manca d'exposició. Hem de pensar que aquest treball va ser realitzat en període escolar, durant el qual els nens resten moltes hores fora de les seves llars, i, per altra banda, l'estació de l'any facilita el que aquests nens, en les hores lliures, juguin al carrer, restant encara més hores de permanència a casa.

També podriem pensar que la determinació dels TU no és suficientment sensible per aquest tipus d'exposicions

tenint en compte que les concentracions d'agents electrofílics procedents del tabac en un ambient tancat, en general, no arriben a ser importants. Tantmateix, no s'ha de descartar la possibilitat de què amb un altre tipus d'examen més minuciós (tipus cotinina), haguéssim obtingut resultats positius.

3.2.- SOBRE L'ESTUDI DE L'EXPOSICIÓ AL PERCLORETILÈ

3.2.1.- ESTUDI SOBRE L'EXPOSICIÓ LABORAL AL PER

L'estudi portar a terme amb el PER representa un intent d'aplicació de la tècnica de determinació de TU a les intoxicacions professionals. En aquest sentit, una vegada revisades les possibilitats en el nostre entorn es va decidir començar el treball amb persones exposades laboralment al PER; en primer lloc, empleats d'establiments de neteja en sec (tintorereries) i, posteriorment en treballadors d'una planta productora d'aquest dissolvent.

Els treballadors de les tintorereries són una població assequible que es troba sotmesa als vapors de PER aproximadament 8 h. cada dia, donades les característiques dels establiments (llocs que es consideren tancats malgrat la ventilació obligatòria). A més, normalment, no acostumen a fumar en aquest ambient, amb el que evitem la interferència d'aquest tòxic.

Aquest tipus de treballadors constitueixen una de les poblacions més afectades pel PER, ja que, encara que la

neteja en general, es realitza en sistemes tancats, l'operació de treure taques, es porta a terme sense cap protecció.

Els resultats obtinguts demostren una evident relació entre les concentracions del tòxic i l'augment de TU, amb una imatge d'acumulació al llarg de la setmana laboral. Aquesta acumulació ve donada, indubtablement, per les característiques lipofíliques del Percloretilè, que fa que es dipositi fàcilment en els teixits.

Tantmateix hem de resaltar que les xifres de TU obtingudes són relativament baixes i es corresponen amb els valors que podriem considerar normals per als individus no fumadors. De totes maneres hem de recordar que aquests treballadors van estar exposats a concentracions ambientals de PER de 15 a 45 ppm, és a dir, molt per sota dels límits legals (100 ppm) vigents al nostre país. Malgrat aquestes lleus concentracions de tòxic, és realment significatiu l'increment i constant en tots els casos al llarg de la setmana que no pot explicar-se tant sols com a un fenomen de variabilitat personal.

No s'ha d'excloure la possibilitat de que en exposicions més greus (concentracions ambientals més elevades) s'incrementarà l'eliminació de TU al ser insuficient la via normal d'eliminació respiratòria per eliminar el tòxic; el que sembla evident és que a aquest grau de concentració ambiental no és útil realitzar una sola determinació, però sí una monitorització a llarg termini.

Quant a les experiències en els treballadors de la planta productora de PER, s'obtenen les xifres global-

ment superiors si considerem com a patró de base el que pot establir-se en individus controls fumadors i no fumadors (veure Resultats).

En un primer moment, l'absència de diferències estadístiques, va fer pensar que l'hàbit tabàquic fos un agent interferidor que amagués les petites diferències que poden establir-se amb aquest producte donada la seva limitada capacitat de biotransformació. Tantmateix, descartats aquells casos d'individus fumadors, tampoc hi va haver diferències significatives. Aquests resultats negatius no han d'interpretar-se com un fet contradictori amb la hipòtesi primitiva, sinó al contrari, com una evident absència d'exposició. S'ha de tenir en compte que els circuits de producció del PER són tancats i els treballadors actuen pràcticament durant tota la jornada, a l'aire lliure. Recordem que la concentració ambiental de PER va ser imperceptible en les anàlisis que habitualment porta a terme la pròpia empresa al llarg de l'any. Probablement les xifres de TU augmentarien molt més en una situació d'intoxicació aguda, encara que en aquest cas aquesta determinació ja no tindria sentit.

En aquest estudi ha existit certa dificultat a l'elaborar els resultats, ja que han sigut moltes les mostres d'orina que han presentat xifres de creatinina inferiors a 5 mmol/l. Aquestes quantitats tan baixes de creatinina es poden deure a dues causes: o bé l'orina és realment diluïda, o bé el propi individu, fraudulentament, la dissol amb aigua per compensar l'oblit. Sigui per una causa o altra, aquestes orines han hagut de ser descartades

Això ha impedit que puguéssim disposar de les tres de terminacions de cada individu corresponents als tres dies

de recollida de mostres, i, conseqüentment, que pugués-
sin analitzar-se en cadascun d'ells, les variacions
d'eliminació dels TU, com vàrem fer en l'anterior tre-
ball.

Per tant, les dades de cada grup han hagut de ser
considerades com a dades independents, i no com aparia
des o deponents, com era la nostra intenció inicial.

En la bibliografia existent fins el moment, no està
descrita la biotransformació del PER a través del sis-
tema GST-GSH. El PER té la seva via d'entrada fonamental-
ment respiratòria, és molt lipofílic i es diposita en
el greix corporal. L'eliminació es produeix principalment
a través dels pulmons, tant sols una mínima part es me-
tabolitza eliminant-se per l'orina. En aquest sentit, Yll
ner, el 1961, va descriure diferents processos de bio-
transformació que finalitzen en metabòlits clorats com
àcid tricloroacètic, àcid oxàlic i àcid dicloroacètic
(178). És precisament en aquest treball on l'autor insi-
nua la possible existència d'un pas previ a epòxid. No-
saltres pensem que si això és així, aquest epòxid seria
suficientment electrofílic, com per a unir-se al gluta-
tion i resultat en la formació d'un tioèter, i explica-
ria l'augment progressiu de TU en el decurs de la set-
mana laboral. Per altra banda, els estudis d'Stewart i
cols. (155) demostren clarament el fenomen d'acumulació
del PER, observat per nosaltres en el present estudi. En
efecte, després de sotmetre a diversos voluntaris a con-
centracions atmosfèriques d'aquest dissolvent de l'or-
dre de 100 ppm i durant 7 hores, se segueix eliminant
aquest producte a través dels pulmons durant vàries ho-
res, o inclús dies, si l'exposició es prolonga.

Degut a aquesta liposolubilitat, el PER no pot ser eliminat pel ronyó, pel que la via fonamental d'eliminació ha de ser la respiratòria. En aquest sentit recorda la cinètica dels anestèsics volàtils. No obstant, no s'ha de descartar l'existència de vies metabòliques que permetin transformar aquest producte en derivats menys liposolubles i eliminables per ronyó. La presència de tioèters urinaris secundària a l'exposició continuada al PER; és un fort argument per a suposar que l'esmentat producte és parcialment metabolitzat en el fetge (i potser en altres teixits) per la família de les Glutation S-Transferases. Aquests emtabòlits serien fàcilment eliminables per ronyó, com passa en tots els conjugats.

La transcendència d'aquesta via metabòlica en el context general de la farmacocinètica del PER resta per avaluar. Encara que en situacions, que podem considerar normals, el percentatge de transformació d'aquest producte en tioèters sigui escàs, és possible, que en altres, en les que la concentració ambiental sigui superior (no estudiada per nosaltres) aquesta via metabòlica adquireixi una gran importància com a mecanisme de protecció.

En efecte, la liposolubilitat del PER, fa suposar que la quantitat absoluta, soluble en sang, sigui elevada, amb el que la difusió als teixits no s'ha de produir fins que sobrepassi el límit de saturació en sang. Fins aquest moment, seria explicable que l'única via d'eliminació fos el pulmó, però a concentracions superiors podria desencadenar una metabolització hepàtica de més intensitat.

En qualsevol cas, atenent a la teleologia de les reaccions de formació de TU, la conjugació del perclo-retilè amb el glutation, representa indubtablement, un mecanisme de protecció contra la lesió cel.lular irreversible.

Podem concluir, doncs, que una monitorització en aquest tipus de treballadors, ens permetrà controlar més adequadament el grau d'exposició real i la capacitat de detoxificació de l'organisme, ja que encara a concentracions relativament baixes, l'acumulació és evident.

3.2.2.- ESTUDI SOBRE EL METABOLISME DEL PER EN FETGE DE RATA I RATOLÍ.

Característiques de l'enzim.

Tal com havia descrit Habig (69), el mètode més emprat en un principi, i que es basava en la transformació de l'alcohol alílic i posterior determinació de GSH residual, es mostra poc eficaç, degut a l'escassa activitat específica de l'enzim de la fracció soluble hepàtica sobre l'esmentat substrat. Aquest mètode té, a més, l'inconvenient de que es donen interferències amb el GSH i altres mercaptans endògens presents en el fetge. Per això hem preferit continuar les nostres experiències, emprant el CPNB com a substrat. Els resultats presentats respecte a la caracterització de l'enzim en la fracció soluble nativa, reproduïxen els resultats obtinguts per

Habig (basant-nos en les condicions per ell descrites). No obstant, considerem que s'han d'extendre aquestes investigacions a condicions més favorables que permetin mantenir la linealitat de la reacció enzimàtica més enllà dels tres minuts. En aquest sentit, sembla possible, com de fet després vam comprovar, treballar amb concentracions de proteïnes inferiors a les que corresponen a 0,1 ml de fracció soluble, el que ens permetria observar més detalladament els fenòmens d'inducció, inhibició, etc., que poden alterar aquest perfil d'activitat enzimàtica.

Així mateix tenim present que no fem diferenciacions entre els distints tipus d'isoenzims que existeixen en la fracció soluble. Per això els valors de $V_{m\grave{a}x}$ i K_m que hem trobat, encara que resten en el rang descrit per Habig per aquests isoenzims, no corresponen a cap forma concreta dels mateixos.

Nosaltres creiem que en el futur tindria gran interès estudiar els efectes de cada producte sobre les diferents GST, A, B, C, E, etc., emprant el substrat més idoni per a cada una d'elles, encara que, per altra banda, l'avantatge de treballar amb fracció soluble no purificada és que es reproduïx més veraçment la situació que té lloc "in vivo".

Efectes del PER sobre l'activitat GST després de l'administració "in vivo" al ratolí.

Aquest va ser un treball preliminar de sondeig per

averiguar què passava en el ratolí després de l'administració via oral del PER.

Encara que els resultats ací presentats recolzen fortament una inhibició de l'activitat enzimàtica, la gran variabilitat de resposta al PER "in vivo" i l'elevada mortalitat que provoca a les dosis necessàries per a observar l'esmentada inhibició, fa difícil el seu ús. En aquest sentit s'ha de remarcar que la intencionalitat d'aquest treball no era demostrar la toxicitat d'aquest producte en el sentit clàssic de la paraula, sinó conèixer si podia ser o no substrat de la GST. Tantmateix, el PER, com també passa amb el tetraclorur de carboni, és massa tòxic per als animals d'experimentació, i és molt difícil poder realitzar adequadament estudis dosi-efecte.

Efectes enzimàtics del PER "in vitro" sobre fetge de rata.

En aquest treball s'aconsegueix treballar en condicions òptimes que permetin mantenir la linealitat de la reacció enzimàtica més enllà dels tres minuts, reduint la concentració de proteïnes a la meitat. Per altra banda s'aconsegueix solubilitzar el PER en la FS utilitzant etanol, amb el que es fa possible un estudi més precís del poder inhibitori d'aquest producte sobre l'activitat enzimàtica GST.

Respecte als resultats obtinguts, en una primera fase

en la que la solubilització del PER s'obtenia per agitació, demostren clarament l'existència d'una inhibició de la GST, si bé no podem conèixer amb exactitud les cacterístiques de la mateixa al no saber la quantitat de PER dissolta en la FS.

Quan solubilitzem el tòxic prèviament en etanol, obtenim activitats enzimàtiques que ens permeten concluir que la inhibició de la GST pel PER és de tipus competitiu. Però hem de tenir en compte que són poques les experiències realitzades i que a part dels resultats ací presentats, en altres casos el poder inhibitori del PER sobre la GST no és tan clar. En aquest sentit és precís recordar que el fet de que el PER es transformi en tioèter, mitjançant la intervenció de la GST, no s'explica per una simple reacció de tranferència a la molècula del PER, sinó que ha d'existir un pas previ d'oxidació del PER amb la formació d'un epòxid. Aquest epòxid acceptaria posteriorment la transferència de sofre de part de la GST.

El mètode d'obtenció de la nostra fracció soluble (sobresurant de 10.000xg, durant 1 1/2 h.), implica l'existència de partícules microsomals en quantitat variable i no controlada. Si acceptem la necessitat de que el PER es transformi en un epòxid prèviament a la seva conversió en tioèter, haurem de tenir en compte i controlar la fracció microsomal de la nostra FS. D'aquesta forma es podrien trobar les condicions experimentals òptimes per tal de poder avaluar més acuradament el fenomen d'inhibició competitiu de la GST per part del PER. En efecte, si suposem una FS amb escassa contaminació microsomal (molt centrifugada) trobaríem un PER no transformat i per tant, incapaç de convertir-se en tioèter. Si contràriament

treballem amb una FS relativament rica en fracció microsomal (poc centrifugada), els enzims oxidants de l'esmentada fracció hauran pogut transformar el PER en epòxid i posteriorment la GST actuarà originant-se un tioèter. Tot això explicaria la disparitat de resultats obtinguts fins el moment. Per això es fa necessari en el futur, estudiar d'una forma definida, la formació de tioèter a partir del PER, per una banda, i la reacció oxidativa microsomal per l'altra. Per això s'haurà d'obtenir fracció microsomal crua i fracció soluble, separatament.

Concretament, d'aquest estudi podem treure la conclusió que el PER pot ser substrat de la GST, i, per tant, biotransformar-se a tioèter, sempre i quan segueixi prèviament, algun pas previ que faciliti la conjugació, com pot ser l'oxidació a epòxid.

3.3.- SOBRE L'EXPOSICIÓ LABORAL ALS ASFALTS.

Les xifres de TU obtingudes en aquest estudi, oscil·len de 1 a 13 mmols SH/mol de creatinina i és de destacar sobre tot, la disminució d'aquests valors al llarg de la setmana laboral en tots els casos estudiats.

Aquest perfil d'eliminació de TU, confirmat en l'estudi individualitzat que es va realitzar posteriorment, fa pensar que existeixi un efecte autolimitant en la excreció de tioèters, sobre tot si tenim en compte el fet de que casi tots els individus són grans fumadors.

Resta per avaluar si aquest efecte limitador es deu a una saturació del sistema enzimàtic (probablement de la GST) o a una veritable inhibició del mateix.

En qualsevol cas, però especialment en el darrer, això suposaria un clar augment de risc perquè es desenvolupessin els fenòmens tòxics propis dels compostos electrofílics.

Poc o res s'ha estudiat sobre la toxicitat humana d'aquest tipus d'exposicions degut principalment a la complexa composició d'aquests productes. Així doncs, per a poder explicar els fenòmens observats ens hem de referir a altres experiències que, encara que diferents, poden guardar un paral·lelisme en els mecanismes enzimàtics.

En aquest sentit recordem que Kilpikari (98) descriu un efecte inhibidor de la Glutathion S-Transferasa, du-

rant els 5 primers mesos de contacte inicial amb determinats tòxics, en treballadors acabats d'incorporar a una fàbrica de productes de goma Per altra part Merck i cols. (114), descriuen el 1984 la inductibilitat de l'enzim Aryl Hidrocarbon Hidroxilasa en pacients als que s'aplicava tòpicament detergents contenint quitrans; l'increment de l'activitat d'aquest enzim podria presuposar la producció excessiva d'epòxids que podrien saturar la seva pròpia via de detoxificació (el sistema GSH-GST).

En el nostre cas en concret, no sabem si aquesta disminució de TU es deu a causes d'origen enzimàtic o bé a un esgotament del glutatión endogen. Però podria ser molt bé que durant els primers dies del contacte amb l'asfalt sigui d'una forma directe, sigui mitjançant una inducció de l'AHH, hi hagués un augment de compostos electrofílics, que justificaria una alta concentració de TU. Secundàriament, un esgotament del GSH o una inhibició de la GST podrà explicar la disminució de TU observada. Es podria proposar un estudi més profund del tema reproduint la situació exposicional i analitzant "in vitro", els fenòmens que apareixin. Però aquest tipus d'estudis són de molt difícil realització per la gran complexitat en la composició química dels asfalts.

3.4.- SOBRE L'EXPOSICIÓ AL FUM DEL TABAC.

Els resultats obtinguts per nosaltres en l'estudi general confirma els resultats obtinguts prèviament per altres autors (75,163). En el nostre cas era important tenir els nostres propis controls en no fumadors i conèixer els valors de TU pels fumadors de les marques més corrents de cigarretes al nostre país.

És evident que l'increment en els valors de TU està clarament relacionat amb el nombre de cigarretes consumides i aquesta relació es demostra perfectament en l'estudi individualitzat de la progressió controlada de l'hàbit tabàquic. En aquest cas, és també interessant remarcar que als dos dies de la interrupció del tabac encara eren evidents els nivells de TU, el que demostra un efecte acumulatiu.

El fet de que en el subgrup de grans fumadors (el nomenat G-3), la distribució dels valors de TU es desplacin únicament cap a la dreta, indica la persistència d'un grup de subjectes amb nivells de TU baixos. Si aquests nivells baixos de TU són deguts a una pobre activitat GST o a una pobre activitat AHH (entre altres raons), resta per investigar.

Nosaltres hem obtingut xifres de TU superiors en tots els grups a les referides per Van Doorn i cols. (163), encara que el mètode utilitzat en aquest estudi, per l'esmentat grup holandès, era diferent en alguns punts al que posteriorment ells mateixos utilitzaren i al que nosaltres seguim en aquest i tota la resta de treballs.

També aquests valors són lleugerament superiors als trobats en els nens en l'estudi sobre la Contaminació Ambiental, encara que això pugui ser degut a les petites diferències que s'estableixin per l'edat.

De totes maneres, s'ha de remarcar que en aquests individus no fumadors no s'ha tingut en compte el fenomen del fumador passiu, és a dir, no s'ha valorat la convivència amb fumadors. Aquest fet pot ser important si

tenint en compte que la majoria dels individus participants voluntaris eren estudiants de la nostra Facultat. Això comporta el conviure moltes hores en espais comuns tancats (apartaments, aules, etc.) que sovint presenten un índex elevat de contaminació tabàquica.

Respecte a aquest estudi hem de dir també que no hem observat alteracions en l'eliminació de TU per la influència del cicle menstrual. En un principi havíem cregut que potser l'ocupació hepàtica en la metabolització dels estrògens podia produir variacions en els processos de biotransformació d'aquests compostos electrofílics, però l'increment d'eliminació de TU en relació a l'hàbit tabàquic ha sigut clar, ordenat i lògic i no fa pensar que existeixi cap interferència d'aquest tipus.

Quant a l'estudi comparatiu dels tipus de tabac, no hem trobat diferències quant a TU es refereix entre els consumidors de cigarretes "normals" i "baixes en quitrà".

En la literatura existeix un estudi similar, realitzat pel grup finlandès d'Heinonen i cols. (75), en el que es comparen també els nivells de TU en fumadors de cigarretes "baix" i "mitjà" contingut en quitrà. Aquests autors demostren també que no existeixen diferències d'eliminació d'aquests metabòlits entre ambdós grups.

La importància del nostre estudi radica en la possibilitat de comparar les xifres de TU en cada subjecte, durant varis dies, i per cada tipus de tabac. Aquest tipus d'estudi ens permet arribar a conclusions més fermes i treballar amb un nombre reduït d'individus, ja que

cada voluntari és el seu propi control.

S'ha de fer menció a què els nivells de TU obtinguts per nosaltres són lleugerament superiors als obtinguts pel grup finlandès encara que s'ha de tenir en compte que el tabac que ells han emprat per aquest experiment, tabac americà, conté menys quitrà que el nostre tabac de fabricació nacional (16,3 mg/cig "mitjà contingut", 5,4 mg/dig. "baix contingut", en el tabac americà, en front dels 20,5 mg/cig. tabac "normal, i els 11,5 mg/cig "baix" contingut en el tabac nacional).

També és interessant observar en els nostres resultats com el tabac ros i negre dona el mateix valor de TU en cada individu.

Nosaltres som conscients de que els TU reflexen només una part dels compostos tòxics del tabac, però creiem que aquest tipus d'estudis pot ajudar-nos a trobar les diferències que existeixen realment entre ambdós tipus de tabac.

Es pot pensar que les cigarretes baixes en quitrà han sigut processades per alguna manipulació química o algun procés d'extracció, que originaria un tabac "baix en quitrà real". El fet és que el contingut en nicotina i quitrà és absolutament el mateix en ambdós tipus de cigarretes, baix i normal. Només el gruix del paper, petits forats en el filtre i (en alguns casos) filtres especials, permeten que en les nomenades "màquines de fumar" la concentració del quitrà i de la nicotina en l'aire inhalat per la màquina sigui menor en les nomenades cigarretes "baixes en quitrà", encara que el tabac sigui el mateix.

En aquest cas és evident que els fumadors, compensen la major entrada d'aire en la cigarreta, inhalant més profundament, aprofitant més cada cigarreta o fumant més cigarretes al dia. En els estudis abans esmentats, realitzats recentment per Benowitz (56), es posen en dubte els beneficis d'aquest tipus de tabac i demostren nivells de nicotina similars en ambdós tipus de tabac tant en sang com en orina.

Ja que en la nostra experiència, el nombre de cigarretes es manté constant cada dia i per cada tipus de tabac, hem de suposar que el subjecte inhala el fum amb més intensitat quan fuma cigarretes "baixes en quitrà".

Tots aquests resultats revelen la incertesa de la pretesa salubritat d'aquest tipus de cigarretes. Probablement, si el consumidor fos informat més veraçment sobre la igualtat d'inconvenients i perills per a la salut d'ambdues cigarretes, es contribuiria més i millor a disminuir l'hàbit tabàquic.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

- 1.- La formació de conjugats de glutatión mitjançant la GST, constitueix un important mecanisme de detoxificació de compostos electrofílics d'elevada capacitat mutagènica i carcinogenètica. Per tant, un bon coneixement de les característiques enzimàtiques individuals de la GST contribuirà a la prevenció dels efectes tòxics dels esmentats compostos en l'àmbit professional i social.

- 2.- L'anàlisi dels TU representa una via d'aproximació eficaç, ràpida i senzilla als mecanismes de detoxificació de compostos electrofílics per la via de la GST. Per tant, és de gran utilitat per a portar a terme un seguiment en determinades situacions d'exposició.

- 3.- També permet la seva aplicació a mostres de gran format, per realitzar estudis sobre la contaminació ambiental. En aquest sentit, els nostres resultats s'han revelat capaços de detectar petites diferències entre poblacions exposades a contaminants ambientals i poblacions no exposades.

- 4.- L'augment progressiu de TU al llarg de l'exposició continuada al PER i els estudis "in vitro" realitzats en fetge de rata, posen de manifest una nova via metabòlica de l'esmentat dissolvent. Encara que en els casos estudiats (amb poca concentració ambiental PER) les xifres de TU són relativament baixes, la monitorització controlada dels esmentats TU en treballadors exposats representa un complement adequat per avaluar el grau d'exposició real a l'esmentat tòxic.

- 5.- La disminució de TU en els individus exposats als vapors del quitrà posa en evidència la utilitat de monitoritzar aquets professionals davant del perill que suposa el bloqueig de la via detoxificadora.

- 6.- Hem confirmat la correlació existent entre els nivells de TU i el grau de tabaquisme. Així mateix, hem posat de manifest que el consum de cigarretes baixes en quitrà proporciona els mateixos nivells de TU que les cigarretes normals. Això posa en dubte la pretesa salubritat del seu consum.

- 7.- L'anàlisi dels TU en fumadors és un bon sistema per a realitzar estudis comparatius sobre la toxicitat de diferents tipus i marques de tabac. Així mateix, pot ser útil per a estudiar els efectes del tabac sobre els nomenats fumadors passius, junt amb altres tècniques específiques com les de detecció de mutàgens.

8.- Un estudi combinat de les característiques individuals de la GST i de l'eliminació de TU pot representar en un futur proper una nova via per establir grups de risc elevat en situacions concretes (intoxicacions professionals, tabac i càncer de pulmó, contaminació ambiental i població, i determinades pautes terapèutiques).

9.- En qualsevol cas, davant de xifres de TU elevades s'ha de pensar en una situació de contaminació per compostos electrofílics. Per altra part, en casos d'evident exposició, xifres de TU baixes han de fer-nos sospitar l'existència d'una incapacitat de l'individu per a formar compostos de glutatión o en una inhibició de la GST, per part del tòxic.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Adlkofer F., Scherer G., Hees U.V.; Passive smoking. N. Engl. J. Med. 1985 March 14; vol 312 n^o 11: 719-720.
- 2.-Al-Kassab S., Boyland E., Williams K.; An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione replacement of nitrogroups. Biochem. J. 1963; 87: 4-9.
- 3.-Ames B.N., Cann J.Mc., Yamasaki E.; Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella / mammalian-microsome mutagenicity test. Res 1975; 31: 347-363.
- 4.-Araw J.; El percloroetileno. Lavado en seco. Primeras jornadas profesionales del Gremio Provincial de Tintorerías y Lavanderías de Barcelona, 1982.
- 5.-Arasa F.; El hombre moderno ante la naturaleza y su degradación. Folia humanística 1971 Abril; t-IX n^o 100: 295-315.
- 6.-Auli i Mellado E., Serena i Sender J.M.; Factors principals de contaminació de l'aire urbà. 2^o Ponencia: Ecologia i salut. XI Congrés de metges i biòlegs de llengua catalana. Reus 1980.

- 7.-Bannai S., Kitamura E.; Adaptive enhancement of cystine and glutamate uptake in human diploid fibroblasts in culture. *Biochim. Biophys. Acta* 1982; 721: 1-10.

- 8.-Barker K., Cambi F., Catcott E.J., Chambers L.A., Halliday E.C., Hasegawa A., Heimann H., Jammet H.P., Katz M., Leclerc E., Mc. Care L., Macfarlane W.A., Parker A., Rose H.A., Stenburg R.L., Stephan D.G., Taylor J.R., Thomas D.M., Wexler H.; Efectos de la contaminación del aire sobre la salud. *Contaminación de la atmósfera. Serie monografías de la OMS. Ginebra* 1962; n^o 46: 169-234.

- 9.-Barranquero Aroca M., Goiriena de Gandarias J.; Algunos aspectos del consumo de tabaco en la población de Vizcaya. *Rev. Sanid. Hig. Publica* 1985 Ener. Febr.; n^o 1-2: 101-116.

- 10.-Baumann E., Preusse C.; Über bromphenyl-mercaptursäure. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 1879; 12: 806-810.

- 11.-Benson A.M., Batzinger R.P., Ou S.Y.L., Bueding E., Cha Y.N., Talalay P.; Elevation of hepatic glutathione S-transferase activities and protection against mutagenic metabolites of benzo(a)pyrene by dietary antioxidants. *Cancer Res.* 1978 Dec.; 38: 4486-4495.

- 12.-Bobes García J., Bousoño García M., Hernandez Mejía R., Millan Gonzalez J.; Epidemiología del consumo de alcohol y tabaco en estudiantes de la Universidad de Oviedo. *Rev. Sanid. Hig. Pública* 1985 Marzo Abril; n^o 3-4: 381-394.

- 13.-Borke G.J., Mc. Gilvray J.; Interpretación y utilización de la estadística médica. Ed. Espax Barcelona 1978.

- 14.-Bos R.P., Brouns R.M.E., Thews J.L.G., Henderson P.Th.; DNBC een gevaarlijk geneesmiddel. *Ned. T. Geneesk* 1980 Nr. 20; 124: 780-783

- 15.-Bos R.P., Brouns R.M.E., van Door R., Thews J.L.G., Henderson P.Th.; Non-mutagenicity of toluene, o-, m- and p-xylene, o-methylbenzylalcohol and o-methylbenzylsulfate in the Ames assay. *Mutat. Res.* 1981; 88: 273-279.

- 16.-Bos R.P., Brouns R.M.E., van Doorn R., Theuws J.L.C., Henderson P.Th.; The appearance of mutagens in urine of rats after the administration of benzidine and some other aromatic amines. *Toxicology* 1980; 16: 113-122.
- 17.-Bos R.P., Groenen M., Theuws J.L.G., Leijdekkers Ch., Henderson P.Th.; Metabolism of benzidine-based dyes and the appearance of mutagenic metabolites in urine of rats after oral or intraperitoneal administration. *Toxicology* 1984; 31: 271-282.
- 18.-Bos R.P., Henderson P.Th.; Genotoxic risk of passive smoking. *Rev. Environ Health* 1984; vol IV n^o 2: 161-178.
- 19.-Bos R.P., Hulshof C.T.J., Theuws J.L.G., Henderson P.Th.; Genotoxic exposure of workers creosoting wood. *Br. J. Ind. Med.* 1984; 41: 260-262.

- 20.-Bos R.P., Jongeneelen F.J., Theuws J.L.G., Henderson P.Th.; Exposure to mutagenic aromatic hydrocarbons of workers creosoting wood. Monitoring human exposure to carcinogenic and mutagenic agents. IARC Sci. Publ. A. Berlin, M. Dreper, K. Hemminki and H. Vainio eds. International Agency for research on Cancer Lyon 1984; 59: 279-288.
- 21.-Bos R.P., Leenaars A.O., Theuws J.L.G., Henderson P.Th.; Mutagenicity of urine from nurses handling cytostatic drugs, influence of smoking. Int. Arch. Occup. Environ Health 1982; 50: 359-369.
- 22.-Bos R.P., Neis J.M., van Gemert P.J.L., Henderson P.Th.; Mutagenicity testing with the Salmonella / hepatocyte and the Salmonella / microsome assays. A comparative study with some known genotoxic compounds. Mutat. Res. 1983; 124: 103-112.
- 23.-Bos R.P., Theuws J.L.G., Henderson P.Th.; Excretion of mutagens in human urine after passive smoking. Cancer Lett. 1983; 19: 85-90.

- 24.-Bos R.P., Theuws J.L.G., Henderson P.Th.; Mutagenic activity of 2, 4-dinitrochlorobenzene (DNBC). IRCS Medical Science 1979; 7: 493.
- 25.-Bos R.P., Theuws J.L.G., Leijdekkers Ch.M., Henderson P.Th.; The presence of the mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons benzo(a)pyrene and benz(a)anthracene in creosote P1. Mutat. Res. 1984; 130: 153-158.
- 26.-Bos R.P., van Doorn R., Yih-van de Hurk E., van Gemert P., Henderson P.Th.; Comparison of the mutagenicities of 4-aminobiphenyl and benzidine in the Salmonella / microsome, Salmonella / hepatocyte and host-mediated assays. Mutat. Res. 1982; 93: 317-325.
- 27.-Boyer J.; Hygiène urbaine. Précis de Médecine préventive et d'hygiène. Ed. J.B. Baillière Paris 1973; pp: 195-286.
- 28.-Boylard E., Chasseaud L.F.; Glutathione S-alkyltransferase. Biochem. J. 1969; 115: 985-991.

- 29.-Brouns R.E., Poot M., de Vrind R., Hoek-kon Th., Henderson P.Th.; Measurement of DNA-excision repair in suspensions of freshly isolated rat hepatocytes after exposure to some carcinogenic compounds. Its possible use in carcinogenicity screening. *Mutat. Res.* 1979; 64: 425-432.
- 30.-Brouns R.E., van Door R., Bos R.P., Henderson P.Th.; Inhibition by salicylamide of 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-evoked DNA excision repair in isolated rat hepatocytes. An indication of the involvement of a sulfate ester intermediate in carcinogenesis. *Mutat. Res.* 1980; 71: 155-159.
- 31.-Brouns R.M.E., van Door R., Bos R.P., Mulleners L.J.S., Henderson P.Th.; Metabolic activation of 2-aminofluorene by isolated rat liver cells through different pathways leading to hepatocellular DNA-repair and bacterial mutagenesis. *Toxicology* 1981; 19: 67-75.
- 32.-Brown D.L., Boda W., Stone M.P., Buckpitt A.; High-performance liquid chromatographic assay of cytosolic glutathione S-transferase activity with styrene oxide. *J. Chromatogr.* 1982; 231: 265-272.

- 33.-Buffoni F.; Coppi C., Santoni G.; Determination of thioethers in urine. Clin. Chem. 1982 Jan.; 28(1): 248-250.
- 34.-Cacabelos R.; Tabaco japonés: entre la ciencia y la alevosia. Jano 1985 Nov. 29 - Dic. 10; vol XXIX n^o 666-H: 1763-1766.
- 35.-Carcavallo, Plencovich; citat per Vaquero Puerta J.L. a la ref. 168.
- 36.-Carmagnol F., Sinet P.M., Rapin J., Jerome H.; Glutathione-S-transferase of human red blood cells assay, values in normal subjects and in two pathological circumstances: hyperbilirubinemia and impaired renal function. Clin. Chim. Acta 1981; 117: 209-217.
- 37.-Centro de investigación y asistencia técnica. Barcelona; Instalación de limpieza en seco. Prevención de riesgos higienicos. REVITEC; 45-48.
- 38.-Colton T.; Statistics in medicina. Little, Brown and Company Boston 1974.

- 39.-Courtois Y.; Détection bacterienne (Test d'Ames) des potentialités génotoxiques de substances chimiques. (Apunts pratiques étudiants) Laboratoire de la Ville de Paris 1984-1985.
- 40.-Channa Reddy C., Scholz R.W., Massaro E.J.; Cadmium, methylmercury, mercury and lead inhibition of calf liver Glutathione S-transferase exhibiting selenium-independent glutathione peroxidase activity. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1981; 61: 460-468.
- 41.-Chasseaud L.F.; The role of glutathione and, Glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. Adv. Cancer Res. 1979; 29: 175-274.
- 42..-Chasseaud L.F.; citat per Chasseaud L.F. a la ref. 41.
- 43.-Danpure C.J.; The effect of chloroquine on the metabolism of (³⁵S) cystine in normal and cystinotic human skin fibroblasts. Biochem. J. 1981; 200: 555-563.
- 44.-Darby F.J.; citat per Chasseaud L.F. a la ref. 41.

- 45.-Das M., Dixit R., Mushtaq M., Srivastava S.P., Seth P.K.; Effect of styrene on hepatic mixed function oxidases, Glutathione content and Glutathione S-transferase activity in rats. *Drug Chem. Toxicol.* 1981; 4 (3): 219-227.
- 46.-De Brohun Butler J., Spielberg S.; Accumulation of cystine from glutathione-cysteine mixed disulfide in cystinotic fibroblasts; Blockade by an inhibitor of gamma-glutamyl transpeptidase. *Life Sci* 1982; vol 31: 2563-2570.
- 47.-Dehnen W., Tomingas R., Roos J.; A modified method for the assay of benzo(a)pyrene hydroxylase. *Anal. Biochem.* 1973; 53: 373-383.
- 48.-Dierickx P.; In vitro inhibition of the soluble glutathione S-transferases from rat liver by heavy metals. *Enzyme* 1982; 27: 25-32.
- 49.-Dierickx P.; Toxicologie experimentale. Soluble glutathione S-transferases from rat testes: isoenzyme pattern and lack of inducibility by drug metabolizing enzyme inducers. *Toxicol. Eur. Res.* 1982 Jan; vol IV n^o 1: 47-51.

- 50.-Di Simplicio P.; Glutathione and glutathione S-transferases in rat liver and in plasma after carbon tetrachloride and thioacetamide intoxication. *Pharmacol. Res. Commun.* 1982; vol 14 n^o 9: 909-921.
- 51.-Dixit R., Das M., Mushtaq M., Srivastava S., Seth P.; Depletion of glutathione content and inhibition of glutathione S-transferase and aryl hydrocarbon hydroxylase activity of rat brain following exposure to styrene. *Neurotoxicology* 1982; 3: 142-145.
- 52.-Dubos R.; L'home et l'adaptation au milieu. Payot Paris 1973.
- 53.-Ellman G.L.; Tissue sulphhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959; 82: 70-77.
- 54.-Engels von Lothar-H., Schutz A., Wolf D.; Perchloräthylen in chemischreinigungen schadstoffsituation - technische prophylaxe. *Staub-Reinhalt* 1975 Nov. 11; luft 35:412-415
- 55.-Falk K.; Urinary mutagenicity caused by smoking. Sorsa M., Vainio H. (eds) *Mutagens in our environment*. Liss, New York. 1982; pp: 387-400.

- 56.-Ferrer J.; Contaminación ambiental y salud. Tribuna médica. 1985. Nov. 26; 26.
- 57.-Ferrer J.; Efectos nocivos del tabaco. Tribuna médica 1985 Febr. 1; 1067: 26.
- 58.-Gahl W.A., Tietze F., Bashan N., Steinherz R., Schulman J.D.; Defective cystine exodus from isolated lysosome--rich fractions of cystinotic leucocytes. J. Biol. Chem. 1982 Aug. 25; vol 257 n^o 16: 9570-9575.
- 59.-Generalitat de Catalunya. Departament de Sanitat i Seguretat Social; "Informe: el tabaquisme a Catalunya". Serie Promoció de la salut. Barcelona 1983.
- 60.-Goiti J.; El tabaco causa 250 muertes diarias en Gran Bretaña. Jano 1985 Nov. 29 - Dic. 10; vol XXIX n^o 666-H: 1769-1770.
- 61.-Goldstein A., Aronow L., Kalman S.M.; Principles of drug action: the basis of Pharmacology. A. Wiley biomedical--health publicatium New York 1974.

- 62.-Griffith O.W.; The role of glutathione turnover in the apparent renal secretion of cystine. J. Biol. Chem. 1981 Dec. 10; vol 256 n^o 23: 12263-12268.
- 63.-Groven P.L.; Glutathione S-transferases in the detoxification. Biochem. Soc. Trans. 1982; 10 (2): 80-82.
- 64.-Guthenberg C., Alin P., Mannervik B.; Glutathione transferase from rat testis. Methods Enzymol. Ed. A. Meister Academic Press Orlando 1985; vol 113: 507-509.
- 65.-Guthenberg C., Mannervik B.; Glutathione S-transferase (transferase α) from human placenta is identical or closely related to glutathione S-transferase (transferase β) from erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta 1981; 661: 255-260.
- 66.-Habig W.H., Kamisaka K., Ketley J.N., Pabst M.J., Arias I.M., Jakoby W.B.; Glutathione metabolism and function. I.M. Arias and W.B. Jakoby eds. Raven, New York 1976; pp: 225-231.

- 67.-Habig W.H., Pabst M.J., Fleischner G., Gatmaitan Z., Arias I.M., Jakoby W.B.; The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1974 Oct.; vol 71 n^o 10: 3879-3882.
- 68.-Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B.; Glutathione S-transferase AA from rat liver. Arch. Biochem. Biophys. 1976; 175: 710-716.
- 69.-Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B.; Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 1974 Nov. 25; vol 249 n^o 22: 7130-7139.
- 70.-Hayakawa T.; Glutathione S-transferases in the metabolism of foreign compounds. Ecotoxicol. Environ Safety 1977; 1: 305-309.
- 71.-Hayakawa T., Lemahiev R., Udenfriend S.; Studies of glutathione S-arene oxidase transferase-A sensitive assay and partial purification of the enzyme from sheep liver. Arch. Biochem. Biophys. 1974; 162: 223-230.

- 72.-Hayakawa T., Udenfriend S., Haruhiko Y., Donald M.J.;
Substrates and inhibitors of hepatic glutathione S-epoxide transferase. Arch. Biochem. Biophys. 1975; 170: 438-451.
- 73.-Hayakawa T., Udenfriend S.; A simple radioisotope assay for microsomal aryl hydroxylase. Anal. Biochem.; 51: 501-509.
- 74.-Heinegard D., Tiderstrom G.; Determination of serum creatinine by a direct colorimetric method. Clin. Chim. Acta 1973; 43: 305.
- 75.-Heinonen T., Kytöniemi V., Sorsa M., Vainio H.; Urinary excretion of thioesters among low-tar and medium-tar cigarette smokers. Int. Arch. Occup. Environ Health 1983; 52: 11-16.
- 76.-Henderson P.Th.; Development and maturation of drug-metabolizing enzymes. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinetics 1978; 1: 1-14.

- 77.-Henderson P.Th., van Doorn R., Leijdekkers C.M., Bos R.P.; Excretion of thioethers in urine after exposure to electrophilic chemicals. Monitoring human exposure to carcinogenic and mutagenic agents. IARC Sci. Publ. A. Berlin, M. Dreper, K. Hemminki and H. Vainio eds. Lyon, International agency for research on Cancer 1984; n^o 59.
- 78.-Hernandez G., Ministerio de Sanidad y Consumo; Especial tabaco. Análisis de 70 marcas de cigarrillos. Ciudadano 1986 Ener.; 137: 46-55.
- 79.-Hesse S., Jernström B., Martinez M., Guenther T., Orrenius S.; Inhibition of binding of benzo(a)pyrene metabolites to nuclear DNA by glutathione and glutathione S-transferase B. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1980; vol 94 n^o 2: 612-617.
- 80.-Hetu C., Yelle L., Joly J.G.; Influence of ethanol on hepatic glutathione content and on the activity of glutathione-S-transferases and epoxide hydrase in the rat. Drug Metab. Dispos. 1981; vol 10 n^o 3: 246-250.

- 81.-Ikeda M.; Metabolism of trichloroethylene and tetrachloroethylene in human subjects. Environ Health Perspect. 1977; 21: 239-245.
- 82.-Ikeda M., Ohtsuji H., Imamura T., Komoike Y.; Urinary excretion of total trichloro-compounds, trichloroethanol and trichloroacetic acid as a measure of exposure to trichloroethylene and tetrachloroethylene. Br. J. Ind. Med. 1972; 29: 328-333.
- 83.-Instituto de petrolquímica aplicada. Universidad Politécnica de Barcelona. Seminario: Contaminación atmosférica; Barcelona Junio 1984.
- 84.-Jaffé M.; Über die nach einföhrung von brombenzol und chlorbenzol in organismus entstehenden schwefelhaltigen säuren. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft 1879; 12: 1092-1098.
- 85.-Jaffé M.; Üeber den niederschlag, welchen picrinsäure in normalen harn erzeugt und über eine neue reaction des kreatinins. Hoppe Seylers Z Physiol. Chem. 1886; 10: 391.

- 86.-Jagun O., Ryan M., Waldron H.A.; Urinary thioether excretion in nurses handling cytotoxic drugs (letter). Lancet 1982 Aug. 21; 2(8295): 443-444.
- 87.-Jakoby W.B.; Glutathione transferases-an overview. Methods in Enzymology. Ed. A. Meister. Academic Press. Orlando 1985; vol 113: 495-498.
- 88.-Jakoby W.B., Habig W.H., Keen J.H., Ketley J.N., Pabst M.J.; citat per Chasseaud L.F. a la ref. 41.
- 89.-Jaskot R.H., Charlet E.G., Grose E.C., Grady M.A.; An automated analysis of glutathione peroxidase S-transferase, and reductase activity in animal tissue. J. Anal Toxicol. 1983 March / April; vol 7: 86-88
- 90.-Jensson H., Alin P., Mannervik B.; Glutathione transferase isoenzymes from rat liver cytosol. Methods in Enzymology. Ed. A. Meister. Academic Press. Orlando 1985; vol 113: 504-506.
- 91.-Jimenez-Sanchez A., Guerrero R.; Detección de sustancias mutagénicas. Test de mutagenicidad en Salmonella typhimurium (método de Ames). Genética molecular bacteriana. Editorial Reverte Barcelona 1982; pp: 345-366.

- 92.-Jonas A.J., Greene A.A., Smith M.L., Schneider J.A.;
Cystine accumulation and loss in normal, heterozygous,
and cystinotic fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci.
U.S.A. Medical Sciences. 1982 July; vol 74: 4442-4445.
- 93.-Jonas A.J., Smith M.L., Schneider J.A.; ATP-dependent
lysosomal cystine efflux is defective in cystinosis. J.
Biol. Chem. 1982 Nov. 25; vol 257: n^o22: 13185-13188.
- 94.-Jongeneelen F., Leijdekkers C., Bos R.P., Theuws J.,
Henderson P.Th.; Excretion of 3-hydroxy-benzo(a)pyrene
and mutagenicity in rat urine after exposure to
benzo(a)pyrene. J. Appl. Toxicol. 1985; vol 5 n^o 5:
277-281.
- 95.-Jongeneelen F., Leijdekkers C., Henderson P.Th.; Urinary
excretion of 3-hydroxy-benzo(a)pyrene after percutaneous
penetration and oral absorption of benzo(a)pyrene in
rats. Cancer Lett. 1984; 25: 195-201.
- 96.-Kaplowitz N., Kuhlenkamp J., Clifton G.; Drug induction
of hepatic glutathione S-transferase in male and female
rats. Biochem. J. 1975; 146: 351-356.

- 97.-Kilpikari I.; Correlation of urinary thioethers with chemical exposure in a rubber plant. *Br. J. Ind. Med.* 1981; 38: 98-100.
- 98.-Kilpikari I., Savolainen H.; Increased urinary excretion of thioether in new rubber workers. *Br. J. Ind. Med.* 1982; 39: 401-403.
- 99.-Kouri R.E., Mc. Kinney C.E., Slomiany D.J., Snodgrass D.R., Wray N.P., Mc. Lemore T.L.; Positive correlation between high aryl hydrocarbon hydroxylase activity and primary lung cancer as analyzed in cryopreserved lymphocytes. *Cancer Res.* 1982 Dec.; 42: 5030-5037.
- 100.-Lamotte M.; *Estadística biológica*. Ed. Toray-Masson Barcelona 1975.
- 101.-Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.; Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; vol 193: 265-275.
- 102.-Malloy M., Rassin D.K., Gauli G.E.; A method for measurement of free and bound plasma cyst(e)ine. *Anal. Biochem.* 1981; 113: 407-415.

- 103.-Manufacturing Chemists Association; Properties and essential information for safe handling and use of perchloroethylene. Chemical Safety Data Sheet 1971; SD 24: 1-15
- 104.-Mar H., Mc. Ketta J.; Asphalt composition. Encyclopedie of Chemical Technology; vol 2: 784-793.
- 105.-Maron D.M., Ames B.N.; Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res. 1983; 113: 173-215.
- 106.-Marti i Valls J.; Problemes de contaminació física i química del medi. 2^o Ponència: Ecologia i salut. XI Congrés de metges i biòlegs de llengua catalana Reus 1980.
- 107.-Matsumoto T., Yoshida D., Mizusaki S., Okamoto H.; Mutagenic activity of aminoacid pyrolysates in Salmonella typhimurium TA 98. Mutat. Res. 1977; 48: 279 - 286.
- 108.-Mayberry R.M.; Cigarette smoking, Herpes simplex virus type 2 infection, and cervical abnormalities. Am. J. Public. Health 1985; vol 75 n^o 6: 676-679.

- 109.-Mayor Zaragoza F.; Incidencia del medio ambiente interno en alteraciones patológicas que cursan con retraso mental. Información y terapeutica de la Seguridad Social 1985 Marzo; vol 9 n^o 3: 57-63.
- 110.-Mc.Lemore T.L., Martin R.R., Wray N.P., Cantrell E.T., Busbee D.L.; Reassessment of the relationship between aryl hydrocarbon hydroxylase and lung cancer. Cancer 1981; 48:1438-1443.
- 111.-Mc. Namara P.D., Pepe L.M., Segal S.; Cystine uptake by rat renal brush-border vesicles. Biochem. J. 1981; 194: 443-449.
- 112.-Mei Hwang S., Foreman J., Segal S.; Developmental pattern of cystine transport in isolated renal tubules. Biochim. Biophys. Acta 1982; 690: 145-153.
- 113.-Mendoza R.; El tabac com a droga contaminant: epidemiologia del tabaquisme al nostre pais. 2^o Ponència: Ecologia i salut. XI Congrés de metges i biòlegs de llengua catalana Reus 1980.

- 114.-Merk H., Rumpf M., Bolsen K., Wirth G., Goerz G.; Inducibility of arylhydrocarbon-hydroxylase activity in human hair follicles by topical application of liquor carbonis detergens (coal tar). *Br. J. Dermatol.* 1984; 111: 279-284.
- 115.-Mitchell J.R., Potter W.Z., Hinson J.A., Snodgrass W.R., Timbrell J.A., Gillette J.R.; Handbook of experimental pharmacology. J.R. Gillette and J.R. Mitchell eds. Springer, Berlin 1975; vol 28: 383-419.
- 116.-Mitchell J.R., Thorgeirsson S.S., Potter W.Z., Jollow D.J., Keiser H., Bethesda; Acetaminophen-induced hepatic injury: Protective role of glutathione in men and rationale for therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1974; vol 16 n^o 4: 676-684.
- 117.-Mittler J., Pogach L., Ertel N.H., Masek B.; Effects of chronic smoking on testosterone metabolism in dogs. *J. Steroid Biochem.* 1983; vol 18 n^o 6: 759-763.
- 118.-Mizusaki S., Okamoto H., Akiyama A., Fukura Y.; Relation between chemical constituents of tobacco and mutagenic activity of cigarette smoke condensate. *Mutat. Res.* 1977; 48: 319-325.

- 119.-Morel C., Cavigneaux A., Protois M.J.C.; Perchloroethylene. Fiche Toxicologique 1974 INRS; n^o 29.
- 120.-Nagao M., Honda M., Seino Y., Yahagi T., Kanachi T., Sugimura T.; Mutagenicities of protein pyrolysates. *Cancer Lett.* 1977; 2: 335-340.
- 121.-Neis J.M., Brömmelstroet B.W.J., van Gemert P.J.L., Roelofs H.M.J., Henderson P.Th.; Influence of ethanol induction on the metabolic activation of genotoxic agents by isolated rat hepatocytes. *Arch. Toxicol.* 1985; 57: 217-221.
- 122.-Neis J.M., van Gemert P.J.L., Roelofs H.M.J., Bos R.P., Henderson P.Th.; Metabolic activation of N-acetylbenzidine and N,N'-diacetylbenzidine to mutagens, using isolated hepatocytes and the 9000xg liver supernatant from rat, hamster and guinea pig. *Mutat. Res.* 1985; 151: 195-200.
- 123.-Neis J.M., van Gemert P.J.L., Roelofs H.M.J., Bos R.P., Henderson P.Th.; Mutagenicity of benzidine and 4-aminobiphenyl after metabolic activation with isolated hepatocytes and liver 9000 x g supernatant from rat, hamster and guinea pig. *Mutat. Res.* 1984; 129: 13-18.

- 124.-Neis J.M., van Gemert P.J.L., Roelofs H.M.J., Henderson P.Th.; Disappearance of free SH-groups in hemoglobin of man, rat and rabbit after exposure to alkilating agents in vitro. 1984.
- 125.-Neis J.M., Yap S.H., van Gemert P.J.L., Roelofs H.M.J., Henderson P.Th.; Mutagenicity of five arylamines after metabolic activation with isolated dog and human hepatocytes. *Cancer Lett.* 1985; 27: 53-60.
- 126.-Oesch F., Schmassmann H., Ohnhaus E., Althaus V., Lorenz J.; Monooxygenase, Epoxide hydrolase, and glutathione-S-transferase activities in human lung. Variation between groups of bronchogenic carcinoma and non cancer patients and interindividual differences. *Carcinogenesis* 1980; vol 1 n^o 10: 827-835.
- 127.-Ogata M., Takatsuka Y., Tomokuni K., Muroi K.; Excretion of organic chlorine compounds in the urine of persons exposed to vapours of trichloroethylene and tetrachloroethylene. *Br. J. Ind. Med.* 1971; 28: 386-391.

- 128.-OMS; Actitudes y conductas sobre el hábito de fumar de los profesionales sanitarios. Rev. Sanid. Hig. Publica 1985 Ener. Febr.; n^o1-2: 203-212.
- 129.-OMS; Evaluación de la actividad carosogénica y mutagénica de los productos químicos. Serie informes técnicos Ginebra 1974; p: 546.
- 130 OMS; Citat per San Martin H. a la ref. 146.
- 131 OMS; Citat per Vaquero Puerta J.L. a la ref. 168.
- 132.-Oshima R.G., Willis R.C., Furlong C.E., Schneider J.A.; Binding assays for aminoacids: the utilization of a cystine binding protein from Escherichia coli for the determination of acid soluble cystine in small physiological samples. J. Biol. Chem. 1974 Oct. 10; vol 249 n^o 19: 6033-6039.
- 133.-Pabst M.J., Habig W.H., Jakoby W.B.; Glutathione S--transferase A. A novel kinetic mechanism in which the major reaction pathway depends on substrate concentration. J. Biol. Chem. 1974 Nov. 25; vol 249 n^o 22: 7140-7150.

- 134.-Paigen B., Gurtoo H.L., Jun Minowada D.V.M., Houten L., Vincent R., Paigen K., Bejba Parker N., Ward E., Thomson Hayner N.; Questionable relation of aryl hydrocarbon hydroxylase to lung-cancer risk. *N. Engl. J. Med.* 1977 Aug. 18; pp: 346-350.
- 135.-Pardell Alenta H.; El tabaquismo: epidemia de nuestro tiempo. *Med. Clin. (Barcelona)* 1985; 85: 539-541.
- 136.-Parker J.C., Bahlman L.J., Leidel N.A., Stein H.P., Thomas A.W., Wolf B.S., Baier E.J.; Tetrachloroethylene (perchloroethylene). *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 1978; (39) 3 / 78 A-23 - A-29.
- 137.-Pellegrino E.; The role of pharmacology in contemporary health care. Contemporary trends in the training of pharmacologists. A. Pekkarinen, ed., IUPHAR 1976; pp: 10-19.
- 138.-Piedrola Gil G., Cortina Greus P.; Ecología y salud humana. *Medicina preventiva y social. Higiene y sanidad ambiental.* Ed. Amaro. Madrid 1983; Tomo I: 49-66.

- 139.-Piedrola Gil G., Sierra Lopez A., Amaro Lasheras J.;
Lucha antitabáquica. Medicina preventiva y social.
Higiene y sanidad ambiental. Ed. Amaro. Madrid 1983;
Tomo I: 1276-1299.
- 140.-Quillardet Ph., de Bellecombe Ch., Hofnung M.; The SOS
chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotox-
ins: validation study with 83 compounds. Mutat. Res.
1985; 147: 79-95.
- 141.-Quillardet Ph., Hofnung M.; The SOS chromotest, a colo-
rimetric bacterial assay for genotoxins: procedures.
Mutat. Res. 1985; 147: 65-78.
- 142.-Ruffie J.; De la Biologie a la culture. Flammarion,
Paris 1976.
- 143.-Salleras Sanmarti L.; Estrategias actuales de la lucha
antitabáquica. Rev. Sanid. Hig. Pública 1985 Jul. Ag.;
n^o 7-8: 863-906.
- 144.-Salleras Sanmarti L.; Gili Miner M.; Bases del plan de
lucha antitabáquica de la Generalitat de Cataluña. Rev.
Sanid. Hig. Pública 1985 May. Jun.; n^o 5-6: 705-713.

- 145.-Salleras Sanmarti L., Pardell Alenta H., Villalbi Here-
ter J.R., Vaque Rafart J.; Epidemiología del tabaquismo
en la población adulta de Cataluña. I prevalencia del
hábito. Med. Clin. Barcelona 1985; 85: 525-528.
- 146.-San Martín H.; Clima y salud. Salud y enfermedad. Ed.
Científicas La prensa médica mexicana SA México 1983;
pp: 168-184.
- 147.-San Martín H.; Citat per San Martín H. a la ref. 146.
- 148.-Savolainen H., Vainio H., Kilpikari I.; Urinary thioet-
her determination as a biological exposure test. Acta
Pharmacol. Toxicol. 1977; 41 (suppl. IV): 33.
- 149.-Servicio Social de Higiene y Seguridad del Trabajo;
Estudio efectuado sobre el percloretileno (1). Tinto-
limp 1982; 6: 34-36.
- 150.-Servicio Social de Higiene y Seguridad del Trabajo;
Estudio efectuado sobre el percloretileno (2). Tinto-
limp 1982; pp: 32-36.

- 151.-Servicio Social de Higiene y Seguridad en el Trabajo;
Percloroetileno, tetracloretileno $\text{Cl}_2\text{C}::\text{CCl}_2$. Tintolimp 1983; 12: 22-23.
- 152.-Seutter-Berlage F., Van Doorn H.L., Kosse H.G.J., Henderson P.Th.; Urinary mercapturic acid excretion as a biological parameter of exposure to alkylating agents. Int. Arch. Occup. Environ Health 1977; 39: 45-51.
- 153.-Spannins V.L., Venegas P.L., Wattenberg L.W.; Glutathione S-transferase activity: enhancement by compounds inhibiting chemical carcinogenesis and by dietary constituents. JNCI 1982 March; vol 68 n^o 3: 493-495
- 154.-Steinherz R., Tietze F., Gahl W.A., Triche T.J., Chiang H., Modesti A., Schulman J.D.; Cystine accumulation and clearance by normal and cystinotic leukocytes exposed to cystine dimethyl ester. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Medical Sciences. 1982 July; vol 79 pp: 4446-44450.
- 155.-Stewart R.D., Baretta E.D., Dodd Milwaukee H.C., Torkelson T.R., Midland Mich Sc.D.; Experimental human exposure to tetrachloroethylene. Arch. Environ Health 1970 Feb.; vol 20: 224-229

- 156.-Strange R.C., Johnson P.H., Lowton A., Moulton J.A., Tector M., Tyminski R.J., Cotton W.; Studies on the variability of glutathione S-transferase from human erythrocytes. Clin. Chim. Acta 1982; 120: 251-260.
- 157.-Sureda V.; La previsi3n meteorol3gica de la contaminaci3n atmosf3rica. Gaceta Sanitaria municipal. Barcelona 1984 Jun.; 43-47.
- 158.-Thoene J.G., Lemons R.M.; Cystine accumulation in cystinotic fibroblasts from free and protein-linked cystine but not cysteine. Biochem. J. 1982; 208: 823-830.
- 159.-Ussetti P., Roca J.; Asma bronquial i medi ambient. Ann Med. (Barcelona) 1985; vol LXXI n^o 9: 9-11.
- 160.-Vainio H., Savolainen H., Kilpikari I.; Urinary thioethers of employees of a chemical plant. Br. J. Ind. Med. 1978; 35: 232-234.
- 161.-Van Doorn R., Borm P.J.A., Leijdekkers Ch.M., Henderson P.Th., Reuvers J., Van Bergen T.J.; Detection and identification of S-methylcysteine in urine of workers exposed to methylchloride. Int. Arch. Occup. Environ. Health 1980; 46: 99-109.

- 162.-Van Doorn R., Bos R.P., Brouns R.M.E., Leijdekkers Ch.M., Henderson P.Th.; Effect of toluene and xylenes on liver glutathione and their urinary excretion as mercapturic acids in the rat. Arch. Toxicol. 1980; 43: 293-304.
- 163.-Van Doorn R., Bos R.P., Leijdekkers Ch.M., Wagenaars--Zegers M.A.P., Thews J.L.G., Henderson P.Th.; Thioether concentration and mutagenicity in urine from cigarette smokers. Int. Arch. Occup. Environ Health 1979; 43: 159-166.
- 164.-Van Doorn R., Leijdekkers Ch.M., Bos R.P., Brouns R.M.E., Henderson P.Th.; Detection of human exposure to electrophilic compounds by assay of thioether detoxication products in urine. Int. Arch. Occup. Environ Health 1981; 24: 77-92.
- 165.-Van Doorn R., Leijdekkers Ch.M., Bos R.P., Brouns R.M.E., Henderson P.Th.; Enhanced excretion of thioether in urine of operators of chemical waste incinerators. Br. J. Ind. Med. 1981; 38: 187-190.

- 166.-Van Doorn R., Leijdekkers Ch.M., Henderson P.Th.; Citat per Van Doorn R., Leijdekkers Ch.M., Bos R.P., Brouns R.M.E., Henderson P.Th. a la ref. 164.
- 167.-Van Doorn R., Leijdekkers Ch.M., Nossent S.M., Henderson P.Th.; Excretion of TTCA in human urine after administration of disulfiram. *Toxicol. Lett.* 1982; 12: 59-64.
- 168.-Vaquero Puerta J.L.; Ecología humana. Contaminación y salud. *Salud Pública*. Ed. Piramide. Madrid 1982; pp: 105-115.
- 169.-Vaquero Puerta J.L.; Higiene ocupacional. *Salud Pública*. Ed. Piramide. Madrid 1982; pp: 293-314.
- 170.-Vermorcken A.J.M.; Studies on human hair follicles in the field of biochemical, pharmacology and toxicology. *Asean J. Clin. Sci.* 1980 Oct.; vol 1 n^o 4: 276-286.
- 171.-Villalbi J.R., Marti J., Auli E., Conillera P., Milla J.; Morbilidad respiratoria y contaminación atmosférica. *Med. Clín.* 1984; vol 82 n^o 16: 695-697.

- 172.-Villalbi Hereter J.R., Salleras Sanmarti L., Pardell Alenta H., Vaque Rafart J.; Epidemiología del tabaquismo en la población adulta de Cataluña. II Factores actitudinales. Med. Clin. (Barcelona) 1985; 85: 529-532.
- 173.-Warholm M., Guthenberg C., Vonbahr C., Mannervik B.; Glutathione transferases from human liver. Methods in Enzymology. Ed. A. Meister. Academic Press. Orlando 1985; vol 113: 499-504.
- 174.-Weterings P.J.J.M., Van Erp Y.; Serum-free cultivation of human scalp hair follicle keratinocytes: a possible tool for genotoxicity studies 1985; ATLA 12: 145-155.
- 175.-Weterings P.J.J.M., Vermorken A.J.M., Bloemendal H.; A method for culturing human hair follicle cells. Br. J. Dermatol. 1981; pp: 1-5.
- 176.-Wolman A.; Public Health and the environment. Am. J. Public. Health 1985; vol 75 n^o 9: 1049-1051.

177.-World Health Organization International Agency for Research on Cancer. Association of Cancer Registries; Cancer incidence in five continents vol IV. IARC. Sci. Publ. International Agency for Research on Cancer. Lyon 1982; n^o 42.

178.-Yllner Sven; Urinary metabolites of ¹⁴C-tetrachloro ethylene in mice. Nature. August 19, 1961; vol 191: 820.

179.-Zaragoza J.R., Llanos M.; Tabaco y salud. Ed. AC. Madrid 1980.

180.-Zielhuis R.L.; Biological monitoring. Scand. J. Work Environ Health. 1978; 4: 1-18.

FE D'ERRADES

- Pag. 68 - On diu "reactiva" ha de dir "relativa".
- Pag. 95 - Al peu de la Fig. 7, on diu PC 1 PC 2 i PC 3,
cal afegir la PC 4.
- Pag. 112 - On diu 20° C, ha de dir -20° C.
- Pag. 121 - On diu -8mg/dl, ha de dir ≈8mg/dl.
- Pag. 124 - A l'últim paràgraf cal afegir: (concentració
final d'etanol del 4%)
- Pag. 141 - Al 4º paràgraf en lloc de FS = ,1ml, ha de
dir FS = 0,1ml.
- Pag. 148 - A la Fig. 20 les unitats d'activitat enzimàtica
venen expressades en μmols/min/mg de prot,
quan haurien d'anar en mmols/min/mg de prot.
- Pag. 156 - Al 4º paràgraf, on diu "obtenint-se diferències
significatives entre tots els grups", cal
afegir, "excepte entre el grup G-0 i el grup
G-1".
- Pag. 175 - A la primera línia cal afegir "existien diferèn-
cies"

