



Respostes adaptatives sanguínies i musculars en condicions d'arribada limitada d'oxigen

Santiago Esteva i Gras

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.tdx.cat) 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.tdx.cat) 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.tdx.cat) 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.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

**RESPOSTES ADAPTATIVES SANGUÍNIES I
MUSCULARS EN CONDICIONS D'ARRIBADA
LIMITADA D'OXIGEN.**

Tesi Doctoral

Santiago Esteva i Gras

3. Materials i mètodes

“Respostes adaptatives sanguínies i musculars en condicions d’arribada limitada d’oxigen”

3.1. Animals de laboratori

Els animals experimentals utilitzats en els nostres estudis foren rates mascles Sprague-Dawley amb un pes mitjà d'entorn els 250-300g i amb una edat de 6 setmanes. En l'article 2, aquests es dividiren en dos grups experimentals: un grup amb animals **Anemitzats (A)** i un **Grup Control (NA)**. El procés d'anemització durà tres setmanes i consistí en l'extracció d'aproximadament 4ml de sang total en cada extracció i en dies alterns. En finalitzar les tres setmanes, s'extragué el material biològic a estudiar tant del grup A com del NA. Per altra banda, en l'article 1, 3, 4 i 5, els animals foren dividits en 4 grups experimentals de forma aleatòria. El primer grup experimental anomenat **Hipòxic (H)**, fou sotmès a un programa d'hipòxia hipobàrica intermitent (HHI) el qual serà comentat posteriorment. Un segon grup experimental **Post-hipòxic 20 dies (P20)** seguí el mateix programa HHI tot i que les mostres biològiques foren obtingudes al cap de 20 dies d'haver finalitzat l'esmentat programa. S'anomenà **Post-hipòxic 40 dies (P40)** a un tercer grup en el qual l'obtenció de les mostres biològiques fou al cap de 40 dies d'haver finalitzat el programa (20 dies després del grup P20). Aquests períodes P20 i P40 foren utilitzats per observar l'evolució, a mig i llarg termini, dels paràmetres analitzats. En aquest protocol HHI, inicialment es varen establir tres grups controls. Un grup Control 1 es comparà amb el grup H; un altre grup Control 2 es comparà amb el grup P20; i finalment el grup Control 3 es confrontà amb el grup P40. Aquest disseny ens permeté salvar possibles diferències sorgides durant el temps que durà tot el protocol. Pel fet de no apreciar diferències significatives entre els tres grups Controls 1, 2 i 3, aquests s'unificaren en un de sol anomenat **Grup Control (C)**. Aquest grup estigué format per animals als quals no se'ls aplicà cap tractament experimental. Aquests foren establats en la mateixa sala i sota les mateixes condicions que la resta de grups experimentals.

3.1.1. Condicions d'estabulatge

Els animals es mantingueren a l'estabulari de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona (UB) durant 15 dies degut a l'establerta i obligada quarantena. Transcorregut aquest temps, es traslladaren a la sala d'experimentació del Departament de Fisiologia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, on tindria lloc l'aclimatació. Aquesta, es troba sota control del Servei d'Estabulari de Biologia i del Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la UB i amb codi d'autorització 1899 del Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya (actualment Medi Ambient i Habitatge). Abans de començar les aclimatacions, els animals van estar 5 dies a la sala d'experimentació (on hi havia la cambra hipobàrica i on tindrien lloc les exposicions) sense cap tipus de tractament, per tal d'habituar-se i adaptar-se a les noves condicions ambientals (sorolls, temperatura, humitat, etc.) i reduir el possible estrès acumulat durant el trasllat.

La temperatura de l'habitació es mantingué entre 18-24°C, amb una humitat relativa de l'aire entre 45-50%. D'aquesta manera, les condicions climàtiques es mantingueren dins l'interval òptim de supervivència d'aquests animals. Durant les sessions d'aclimatació, les condicions ambientals variaven degut a la hipòxia i al tancament hermètic de la cambra experimental (Vegi's Fig. 17).

En tot moment els animals van tenir menjar i beguda "ad libitum", excepte durant les sessions d'aclimatació (4 hores/dia), en les qual no disposaven d'aigua. Aquest fet s'aplicà tant en els animals experimentals com en els C per tal de reproduir exactament les mateixes condicions en tots els grups. L'aigua que bevien era la d'ús corrent de la ciutat de Barcelona.

El menjar subministrat fou pinso comercial pel·letitzat per a rosegador, proporcionat per l'estabulari de la Facultat de Biologia (UB). Aquest pinso, a part de l'aportació nutritiva necessària, també permet conservar la funció rosegadora dels animals experimentals.

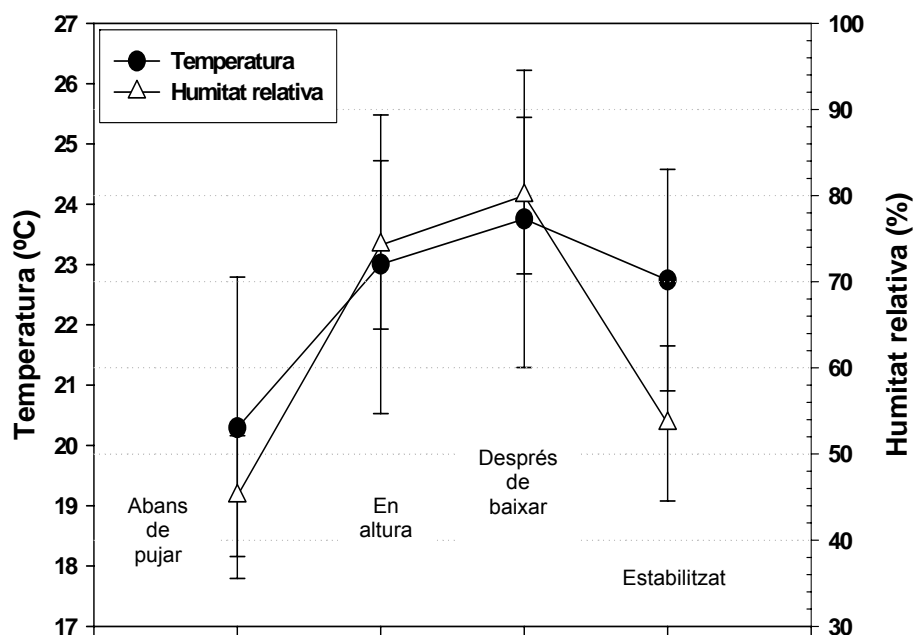


Fig. 17. Gràfica corresponent a les diferents temperatures i humitats relatives durant les sessions d'aclimatació a HHI

Les gàbies on es mantingueren els animals tenien les mesures recomanades en amplada (27cm), longitud (50cm) i altura (14cm) (Zúñiga et al., 2001). No es confinaren més de 3 animals per gàbia, assegurant d'aquesta manera l'espai vital mínim òptim de 250cm² per animal. Les gàbies i els encenalls es canviaren diàriament i al menys un cop durant el cap de setmana, conservant d'aquesta manera, la mínima higiene necessària.

Cada dia s'examinaven tots els animals per a la detecció de possibles ferides (per automutilació, baralles, etc.). També es controlà la ingesta, el consum d'aigua, la quantitat i qualitat de les femtes i el pelatge. Això es feu amb l'objectiu d'adonar-nos de possibles anomalies en l'etologia i/o problemes de l'aparell digestiu dels animals. Cal emfatitzar que no hi va haver cap incidència remarcable.

Tots els protocols realitzats en els nostres estudis foren aprovats pel Comitè Ètic de la Facultat de Biologia i els animals emprats reberen un tracte humanitari, d'acord amb els principis fixats i les actuals lleis de protecció dels

animals utilitzats per a experimentació i altres finalitats científiques (Vegi's l'Annex 1 per documents i certificats acreditatius).

3.2. Protocol experimental HHI (articles 1, 3, 4 i 5)

El protocol HHI (hipòxia hipobàrica intermitent) consistí en sessions d'aclimatació de 4 hores de durada per dia (de 9:00 a 13:00 hores), 5 dies a la setmana (de dilluns a divendres) i durant 22 dies. Per tant, els animals varen estar exposats a hipòxia hipobàrica intermitent durant un total de 88 hores. En totes les sessions d'exposició a la cambra hipobàrica, s'assolia una pressió interna de 540mbars, que correspon a una altura de 5000m.

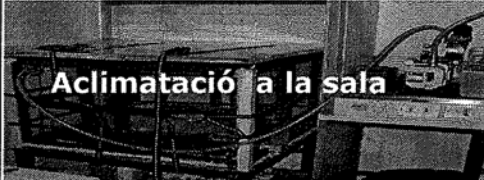
La pressió atmosfèrica és la pressió que exerceix l'atmosfera que rodeja la terra sobre tots els objectes que es troben en contacte amb ella. La pressió atmosfèrica canvia amb l'altitud: a major altitud, menor pressió. Un augment de 1.000m d'altitud representa una disminució de pressió atmosfèrica d'aproximadament 100hPa.

Altura en m.	Pressió en hPa (mbars)
0	1.013,25
1.000	898,75
5.000	540,21
10.000	264,36
15.000	120,45
20.000	54,75

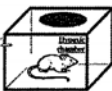
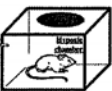
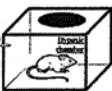
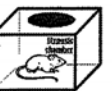
El temps que s'invertia en pujar gradualment els animals als 5000m era de 30 minuts aproximadament. També s'empraven 30 minuts per baixar-los de forma gradual fins a nivell del mar després de les 4 hores d'exposició a la hipòxia. Aquests 30 minuts eren suficients per tal de no provocar-los cap tipus de xoc, alteració, ni estrès degut al canvi de pressió. També es feu un seguiment de l'evolució dels pesos de cada un dels animals en les diferents



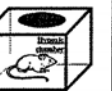
etapes del protocol per tal de detectar possibles alteracions en el patró de creixement dels diferents grups experimentals.

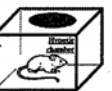

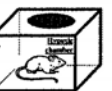
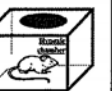

L'esquema del programa d'hipòxia hipobàrica intermitent utilitzat pel nostre grup de *Fisiologia de l'Exercici i Hipòxia* és el següent:

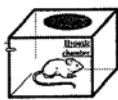
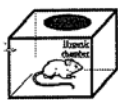


Horari	Dia -7	Dia -6	Dia -5	Dia -4	Dia -3	Dia -2	Dia -1
9:00– 10:00			Arriben els animals experimentals a la sala d'experimentació (on hi ha la cambra hipobàrica)				
10:00– 11:00							
11:00 – 12:00							

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



Horari	Dia 8	Dia 9	Dia 10	Dia 11	Dia 12	Dia 13	Dia 14
9:00 – 13:00h	Sessió d'acclimatació 	Sessió d'acclimatació 	Sessió d'acclimatació 	Sessió d'acclimatació 	Sessió d'acclimatació 	Descans	Descans

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



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

Horari	Dia 29	Dia 30	Dia 31	Dia 32	Dia 33	Dia 34	Dia 35
9:00 – 13:00h	Sessió d'aclimatació 	Sessió d'aclimatació  FI					
15:00-19:00h	Extracció Mostres  Grup Hipòxic + Control	Extracció Mostres 					

Dia 36	Dia 37	Dia 38	Dia 39	Dia 40	Dia 41	Dia 42
Setmana de Recuperació. Manteniment adequat dels animals establats.						
Dia 43	Dia 44	Dia 45	Dia 46	Dia 47	Dia 48	Dia 49
Setmana de Recuperació. Manteniment adequat dels animals establats.						

Dia 50	Dia 51	Dia 52	Dia 53	Dia 54	Dia 55	Dia 56
Extracció Mostres  Grup Post20_a + Control	Extracció Mostres 					

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

Dia 71	Dia 72	Dia 73	Dia 74	Dia 75	Dia 76	Dia 77
Extracció Mostres  Grup Post40_a + Control	Extracció Mostres 					

3.2.1. Cambra hipobàrica

En aquest estudi s'emprà una cambra hipobàrica de dimensions reduïdes per tal de sotmetre als animals al programa HHI (Vegi's Fig. 18). El volum total de la cambra és d'aproximadament 450 litres (65x90x80cm), podent introduir-hi fins a 4 caixes de rates. Les parets de la cambra són de plàstic metacrilat, permetent una fàcil visió de l'interior per tal de poder fer un control continuat i un seguiment del comportament dels animals durant l'exposició.

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

Un cop aconseguíem els milibars desitjats (540mbars, 5000m) mitjançant la regulació de diverses vàlvules, fèiem que la bomba estabilitzés aquesta pressió per tal de mantenir-la les 4 hores de durada de cada una de les exposicions.



Fig. 18. Cambra hipobàrica (esquerra) amb la seva corresponent bomba (dreta)

3.3. Tipus de mostres estudiades

Els materials biològics estudiats foren la sang i els músculs: miocardi (MC), diafragma (DG), Tibialis anterior (TA), Extensor digitorum longus (EDL) i Soleus (SOL).

Sang: obtinguda mitjançant punció cardíaca un cop els animals foren adequadament anestesiats. Es feren diferents alíquotes i es processaren de manera pertinent depenent de la finalitat de cada una d'elles: reologia, paràmetres hematològics, proteïnes totals, fibrinogen i estrès oxidatiu.

Miocardi: per a l'estudi bioquímic, es feu un tall transversal en la regió central del ventricle dret i s'utilitzaren dues regions centrals d'aquest ventricle.

Diafragma: per a l'estudi histoquímic s'escolliren tres zones de la *leaflet* regió esquerra costal (Vegi's Fig. 19). I per a l'estudi dels paràmetres bioquímics, s'utilitzaren les mateixes regions però de la zona dreta.

Tibialis anterior: s'utilitzà el múscul TA esquerra per als estudis histoquímics. Es marcaren les diferents regions per tal de saber l'orientació anatòmica dels seus talls i s'analitzaren 5 regions de la zona equatorial ja que, segons Torrella i col·laboradors (2000), cada zona té una composició i unes característiques diferents (article 1, pàgina 205, Fig. 2). El TA dret fou utilitzar per realitzar les proves bioquímiques.

Extensor digitorum longus: l'EDL d'una de les extremitats posteriors fou processat pel seu anàlisi al microscopi electrònic de transmissió (MET) i per als estudis histoquímics. El múscul heterolateral situat a l'altra extremitat s'usà pels estudis

bioquímics d'alguns dels metabòlits involucrats en les funcions musculars.

Soleus: el múscul SOL d'una de les extremitats posteriors fou processat pel seu anàlisi al MET i pels estudis histoquímics. El múscul heterolateral situat a l'altra extremitat també s'usà pels estudis bioquímics d'alguns dels metabòlits involucrats en les funcions musculars.

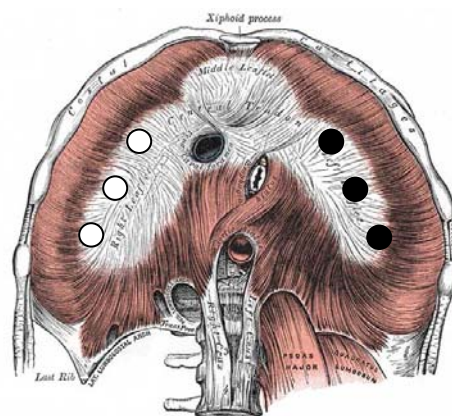


Fig. 19. Esquema del diafragma vist des de sota. Les àrees blanques indiquen les regions analitzades per als estudis histoquímics i les negres pels bioquímics.

NOTA: l'estudi histoquímic del MC també fou dut a terme per un altre membre investigador del grup de *Fisiologia de l'Exercici i Hipòxia*. En aquest experiment s'utilitzà el ventricle esquerre per fer les determinacions pertinents (Panisello et al., 2007).

3.3.1. Extracció i emmagatzematge de mostres

Els anestèsics que s'utilitzaren foren l'uretà (15g uretà/100ml amb dosi d'1ml/100g de pes) i el pentobarbital sòdic (article 2). L'administració fou intraperitoneal degut a la seva cinètica d'absorció i a la facilitat per a la punció. Un cop es confirmava que els animals estaven ben anestesiats verificant diferents reflexos, es procedia a l'extracció dels diversos teixits i òrgans.

Primer de tot s'extragué la sang de cada un dels animals mitjançant una punció cardíaca. De cada animal s'aconseguien extreure entre 7 i 10ml de sang. Aquests es van dividir en dos vials heparinitzats: la sang del primer s'utilitzà per al comptatge hematològic i per a les mesures reològiques; el segon es centrifugà per separar el plasma dels eritròcits tot congelant adequadament aquestes dues parts a -80°C. El plasma congelat va servir per valorar la concentració de proteïnes totals/fibrinogen i el paràmetre d'estrès oxidatiu TBARS; els eritròcits congelats s'utilitzaren per l'estudi dels enzims CAT i SOD.

Acte seguit s'extragueren els TA esquerre i dret i el DG. Un cop s'hagué extret el DG, la manipulació de l'animal s'havia de fer amb rapidesa ja que, amb l'animal sense respirar, certs paràmetres bioquímics podrien veure's afectats. L'últim òrgan en extreure fou el cor, el qual encara batejava dins la caixa toràcica (aquesta s'obrí longitudinalment per la línia central). Just després de l'extracció es pesaren els músculs a excepció del DG (sorgiren moltes complicacions en extreure'l). Les mostres foren congelades i processades seguint els protocols adequats, just després de les extraccions.

Pel què fa a l'EDL i al SOL, s'obtingueren els dos tipus de músculs de cada una de les dues extremitats posteriors. Una pota s'utilitzà per estudis de MET i histoquímica i l'altre pels estudis bioquímics.

Les mostres destinades als estudis bioquímics (TA dret, DG dret i ventricle dret) foren congelades directament en nitrogen líquid i posteriorment conservades a -80°C. Per a l'EDL i el SOL, les determinacions bioquímiques dels metabòlits ATP, PCr, Cr, Pi i lactat, foren dutes a terme uns minuts després de les extraccions.

Les mostres destinades als estudis histoquímics (TA esquerre, DG esquerre, un dels dos EDL i un dels dos SOL) varen ser submergides en 0,5ml del crioprotector isopentà (3-metil-butà) a l'interior de vials i després congelades i

emmagatzemades amb nitrogen líquid a -160°C segons les recomanacions de Dubowitz (1985).

3.3.2. Processament de mostres i paràmetres analitzats

3.3.2.1. Hematològics

Un cop s'hagué extret la sang per punció cardíaca, s'anà disposant en tubs heparinitzats els quals es deixaren en un agitador rodant durant 5 minuts per tal d'homogeneïtzar la mostra i no provocar hemòlisi. Després s'avaluaren els paràmetres hematològics en un contador de cèl·lules Celltac (Nihon Kohden, Corporation Japó).

Els paràmetres hematològics obtinguts i estudiats foren els següents:

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

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

•**Hb** (*hemoglobin*): concentració d'hemoglobina (g/dl).

•**Hc** (*hematocrit*): volum dels eritròcits amb relació a la sang total (%).

•**MCV** (*mean corpuscular volume*): volum corpuscular mig. És el volum mig dels eritròcits en fL i ve determinat per l'expressió:

$$\text{MCV} = (\text{Hc} \cdot 10) / \text{Rc}, \text{ on Rc són milions d'eritròcits per mm}^3 \text{ de sang.}$$

•**MCH** (*mean corpuscular hemoglobin*): l'hemoglobina corpuscular mitja és la quantitat mitja d'hemoglobina per eritròcit, expressada en picograms (10^{-12}g). Es calcula segons l'expressió: $\text{MCH} = (\text{Hb} \cdot 10) / \text{Rc}$

•**MCHC** (*mean corpuscular hemoglobin concentration*): concentració mitja d'hemoglobina dels eritròcits, és a dir, la quantitat d'Hb (en g) que hi ha en 1dL d'eritròcits: $\text{MCHC} = \text{Hb} \cdot (100 / \text{Hc})$

3.3.2.2. Reològics

Per a mesurar els paràmetres reològics, s'utilitzà l'aparell anomenat reòmetre (Vegi's l'Annex 2). Les mostres de sang, un cop eren obtingudes de cada un dels animals, es deixaven en un agitador rodant durant 5 minuts per tal que s'homogeneïtzessin i que no es provoqués hemòlisi. Acte seguit, s'introduïen 0,5ml de mostra en el reòmetre i s'analitzaven els següents paràmetres reològics:

•**Viscositat aparent (η_a):**

Quocient entre *shear-rate* (gradient de velocitat) i *shear-stress* (tensió tangencial) ($\eta_a = \tau_{\text{sang}} / \dot{\gamma}_{\text{sang}}$).

•**Viscositat relativa (η_r):**

Quocient entre la viscositat aparent i viscositat del plasma ($\eta_r = \eta_a / \eta_{\text{plasma}}$).

•**Viscositat plasma (η_{plasma}):**

Quocient entre *shear-rate* i *shear-stress* del plasma ($\eta_{\text{plasma}} = \tau_{\text{plasma}} / \dot{\gamma}_{\text{plasma}}$).

•**Viscositat aparent / Hematòcrit:**

Relació entre la viscositat aparent i l'hematòcrit ($\eta_a (12 \text{ rpm}) / \text{Hc}$).

•**Viscositat relativa / Hematòcrit:**

Relació entre la viscositat relativa i l'hematòcrit ($\eta_r (12 \text{ rpm}) / \text{Hc}$).

•**RBC aggregability (RBCa):**

Índex indicador de l'agregabilitat eritrocitària. RBCa és el principal factor que influeix sobre la viscositat sanguínia a baixos gradients de velocitats.

$$(\eta_{2.25} - \eta_{4.5}) / \eta_{4.5}$$

•**RBC deformability (RBCd):**

Índex indicador de la deformació eritrocitària. RBCd és el principal factor que influeix sobre la viscositat sanguínia a elevats gradients de velocitat.

$$(\eta_{225} - \eta_{450}) / \eta_{450}$$

•**Oxygen delivery index:**

Índex quantificador de l'impacte de la viscositat sanguínia en la capacitat transportadora d'O₂ (Koch, 1995; Viscor et al., 2003). Relaciona l'hematòcrit amb la viscositat.

$$\text{Hematòcrit} / \eta_a (12 \text{ rpm})$$

•**Blood oxygen potential transport capacity**

Índex quantificador de l'impacte de la viscositat sanguínia en la capacitat transportadora d'O₂ (Hedrick et al., 1986; Viscor et al., 2003). S'estudia la relació entre la capacitat transportadora d'O₂ per part de l'hemoglobina (β) i concentració d'hemoglobina [Hb], amb la viscositat de la sang (η_a). Com a valor de β s'assumeix 1,34 ml O₂·g⁻¹ a 38°C.

$$\beta[\text{Hb}] / \eta_a$$

•**Gràfiques Casson:**

Estudi de la relació entre les arrels quadrades de la tensió tangencial ($\tau^{1/2}$) i el gradient de velocitat ($\dot{\gamma}^{1/2}$). Ofereix l'avantatge de permetre el seu tractament com una recta, tot i que per a valors molt baixos, la relació deixa de ser lineal. L'ordenada en origen teòrica rep el nom de tensió tangencial crítica o llinar de fluència ($\tau_0^{1/2}$) ja que suposa l'esforç teòric necessari perquè la mostra estudiada comenci a fluir. La pendent generada s'anomena Equació de Casson ($\eta_c^{1/2}$). El seu càlcul ens serà d'utilitat per contrastar el comportament reològic de la sang dels quatre grups experimentals.

NOTA: els resultats obtinguts d'aquest darrer paràmetre reològic i les pertinents conclusions, es troben a l'Annex 3 d'aquest treball pel fet de no haver estat inclosos en cap dels articles publicats o pendents de publicació.

3.3.2.3. MET - Volum mitocondrial

Per a l'estudi de la distribució i volum mitocondrial, s'utilitzaren les regions equatorials dels músculs EDL i SOL. Es prepararen petits cilindres de teixit (4mm x 1mm x 1mm) de cada secció equatorial i es processaren degudament per al subsegüent estudi (per una descripció detallada vegeu article 2, pàgina 837, *Sample preparation*). El volum mitocondrial fou estudiat utilitzant el MET en tres regions diferenciades de cada fibra muscular: pericapil·lar (regió de la fibra més propera al capil·lar), sarcolemal (regió de la fibra propera al sarcolema) i sarcoplasmàtica (regió més interior de la fibra muscular). Per estudiar aquestes regions s'obtingueren microfotos de diverses fibres triades a l'atzar. Les imatges foren processades digitalment i es calculà la densitat i volum mitocondrial. Per dur a terme aquestes determinacions s'usaren els mètodes estereològics descrits per Weibel (1979).

3.3.2.4. Histoquímics

Utilitzàrem un criòstat (Frigocut Reichert-Jung, Heidelberg, Alemanya) a una temperatura de -20°C per fer la seqüència de talls transversals. Els talls es feren a la regió central/mitja de les mostres i seguidament es muntaren en portaobjectes prèviament gelatinitzats. Després s'incubaren en un tampó de fixació amb l'objectiu d'evitar que els talls es desenganxessin dels portes durant el protocol.

Els tall de les mostres es feren de forma seriada amb l'objectiu que a cada tall es poguessin reconèixer els mateixos camps en les diferents tincions.

Els tres mètodes histoquímics emprats foren:

• ***Mètode succinat deshidrogenasa, SDH (Nachlas et al., 1957):***

Mètode per detectar l'activitat de l'enzim mitocondrial succinat deshidrogenasa, SDH. Aquesta tècnica ens permet diferenciar les fibres oxidatives de les que ho són menys, o dit en altres paraules, diferenciem les fibres aeròbiques de les anaeròbiques.

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

Basat en el mètode original de Padykula i Herman (1995a,b) per detectar l'activitat de Ca^{2+} ATPasa-miofibrilar. Ens permet distingir les fibres de contracció ràpida de les de contracció lenta, tot classificant-les de la següent manera: SO, contracció lenta; FOG i FG, contracció ràpida.

• ***Mètode per a la detecció dels capil·lars, e-ATPasa (Fouces et al., 1993):***

Mètode basat en l'original descrit per Rosenblatt i col·laboradors (1987) que permet la visualització de l'activitat de l'ATPasa de les cèl·lules de l'endoteli capil·lar. D'aquesta forma s'aconsegueix revelar els capil·lars que contacten amb les fibres musculars en els talls transversals realitzats.

Mesures i paràmetres morfomètrics

Fotografiarem diferents regions o camps de cada mostra a diferents augments depenent de cada òrgan amb un microscopi òptic (Olympus BX 40, Japan) equipat amb una càmera digital (Hitachi KP-C550 o SIS CC-12). Les imatges foren captades amb format electrònic mitjançant el programa informàtic AnalySIS® (Soft Imaging System, Alemanya). El processament, tractament i anàlisis de les imatges es feren amb el software Sigma-Scan Pro 5 de Jandel Scientific (Erkrath, Alemanya).

Els paràmetres morfomètrics analitzats foren:

- **Densitat capil·lar (CD):** nombre de capil·lars per mm^2 .
- **Densitat de fibres musculars (FD):** nombre de fibres per mm^2 .
- **FCSA:** àrea de la secció transversal de cada fibra expressada en μm^2 .
- **Perímetre (FPER)** de cada fibra expressat en μm .
- **NCF:** nombre de capil·lars en contacte amb cada fibra.
- **Màxima distància de difusió (MDD):** distància mitja des de la membrana fibril·lar (sarcolema) al centre de la fibra expressada en μm . L'equació del paràmetre MDD és $= \sqrt{(4 \cdot \text{àrea}) / \text{perímetre}}$
- **Shape Factor:** índex de 0 a 1 que indica la morfologia de les fibres. Quan l'índex sigui més pròxim a 1, la fibra s'aproximarà més a una esfera perfecta. $\text{Shape factor} = (4\pi \cdot \text{àrea}) / \text{Perímetre}^2$

A més a més, també s'estudiaren les següents relacions:

- **CCP:** nombre de capil·lars en contacte amb $100 \mu\text{m}$ de perímetre de fibra. $\text{CCP} = (\text{NFC} \cdot 10^2) / \text{Perímetre}$
- **CCA:** nombre de capil·lars en contacte amb $1000 \mu\text{m}^2$ d'àrea de fibra. $\text{CAA} = (\text{NCF} \cdot 10^3) / \text{Àrea}$
- **C/F:** *capillarity-to-fiber ratio*. Densitat Capil·lar/Densitat de Fibres (CD/CF).

En el DG i en el TA s'estudiaren també uns altres paràmetres degut a la diferència de fibres musculars que formen aquests dos músculs:

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

3.3.2.5. Bioquímics

Primerament, s'hagueren d'homogeneïtzar les mostres ja que havien d'estar netes de teixit conjuntiu i greix. S'agafà sempre la mateixa regió del teixit per evitar possibles diferències regionals. Sobre un vas de precipitats que contenia gel, les mostres foren homogeneïtzades en un medi (1:100 pes/volum) que contenia 75mmol de tampó Tris-HCl (Reed et al., 1994). S'utilitzà un politró Potter-Elvehjem per l'homogeneïtzació mecànica.

Un cop es tingueren totes les mostres d'estudi degudament homogeneïtzades, procedirem a les anàlisis de dos enzims (lactat deshidrogenasa i citrat sintasa) i de diferents concentracions de proteïnes (Mb, fibrinògen i proteïnes totals):

• Anàlisi de l'activitat enzimàtica de la lactat deshidrogenasa, LDH:

Basat en el mètode de Beutler (1984). Es realitzaren les lectures en cubetes d'espectrofotòmetre d'1cm de pas de llum i les lectures foren fetes a 340nm en l'espectrofotòmetre Spectronic Genesys 2 (Milton Roy company, EUA) a una temperatura de 37 °C.

L'enzim LDH (EC 1.1.1.27) és un enzim citosòlic glicolític molt utilitzat com a marcador del metabolisme anaeròbic i catalitza la reducció del piruvat a lactat produint una important quantitat de NAD⁺ per a la viabilitat de la glicòlisi anaeròbica. S'ha observat que la seva activitat és més alta en teixits amb alta capacitat glicolítica i que aquesta està altament correlacionada amb l'activitat fosfofructoquinasa (Moore & Gollnick, 1982).

• Anàlisi de l'activitat enzimàtica de la citrat sintasa, CS:

Aquest anàlisi es realitzà utilitzant el mètode de Srere (1969). L'activitat CS es determinà com un augment de densitat òptica (ΔDO) a $\lambda = 412\text{nm}$ i a

37°C. Les lectures es varen fer en un espectrofotòmetre Spectronic Genesys 2 (Milton Roy company, EUA).

L'enzim CS (E.C. 2.3.3.1 [prèviament 4.1.3.7]) és un enzim de la matriu mitocondrial que forma part del cicle de Krebs . En les cèl·lules aeròbiques, aquest cicle és la ruta comuna final del catabolisme oxidatiu de totes les molècules combustibles. En concret, el CS catalitza la condensació de l'Acetil CoA i l'oxalacetat (OAA) per formar citrat:



El CS és un dels enzims reguladors claus en el metabolisme de generació d'energia, ja que en el fetge i altres teixits de mamífers és la porta d'entrada i el pas determinant de la velocitat del cicle esmentat anteriorment. És fortament inhibit per ATP en la majoria dels organismes i s'usa molt àmpliament com a marcador de la capacitat oxidativa, respiratòria o de la maquinària mitocondrial (Daneshrad et al., 2003; Siu et al., 2003).

• **Determinació de la concentració de mioglobina, Mb:**

Per a la determinació de la concentració de Mb, s'utilitzà el mètode de Reynafarje (1963). Es van transferir les solucions de les diferents mostres a cubetes Beckman d'1cm de pas de llum i es va llegir la densitat òptica puntual a 538 i 568nm a l'espectrofotòmetre Spectronic Genesys 2 (Milton Roy company, EUA). La diferència entre les dues densitats òptiques es multiplicà pel factor constant 117,3 i el resultat obtingut expressà la concentració de Mb en mg/g teixit fresc.

La Mb és un pigment respiratori que emmagatzema i transporta O₂ en els músculs dels vertebrats (principalment en teixit muscular G). És equivalent a una subunitat d'Hb i mostra una seqüència de considerable homologia amb la cadena α d'aquesta (Randall et al., 1998). És una hemoproteïna

citoplasmàtica que presenta una estructura globular d'una sola cadena peptídica de 153 aminoàcids i conté en el centre, un grup hemo com a grup prostètic responsable de la unió a l'O₂, CO i NO, al voltant del qual es doblega l'apoproteïna. Té vuit hèlixs alfa (de la A a la H), un nucli hidrofòbic i un pes molecular de 16,700 daltons. L'Hb, amb múltiples grups hemo, presenta una corba de dissociació sigmoïdal, mentre que la Mb, amb un de sol, presenta una corba de dissociació hiperbòlica. Les hemoglobines que presenten altes afinitats per l'O₂ es saturen a baixes ppO₂, mentre que les que mostren afinitats baixes es troben totalment saturades només amb ppO₂ relativament altes. L'afinitat s'expressa en termes del P₅₀, la ppO₂ a la qual l'Hb es troba saturada al 50% d'O₂. Com més baixa és la P₅₀, major és l'afinitat per l'O₂. Les variacions en l'afinitat per l'O₂ entre les diferents hemoglobines estan relacionades amb les diferències en la proteïna globina, no en el grup hemo. Tal i com mostra la corba de dissociació hiperbòlica de la Mb, aquesta presenta una afinitat molt més gran per l'O₂ que l'Hb (Randall et al., 1998).

A més a més de realitzar funcions d'emmagatzematge i transport d'O₂ en múscul, la Mb o també a vegades anomenada miohemoglobina, duu a terme altres funcions addicionals com serien per exemple: limitar l'efecte tòxic dels ROS mitjançant la seva activitat peroxidasa, unir-se a l'òxid nítric (NO) tot evitant el dany mitocondrial per inhibició de la citocrom c-oxidasa, activitat al·lostèrica, etc. (Brunori, 2001; Garry & Mammen, 2003; Giuffrè et al., 2005).

• **Índex d'activitat LDH / CS:**

El quocient entre l'activitat LDH i la CS fou calculat i expressat de forma adimensional com a *ratio* LDH/CS. Aquesta relació és usada generalment com un indicador dels ajustaments relatius entre els potencials metabòlics anaeròbic i aeròbic (Hochachka et al., 1983).

• **Quantificació de proteïnes totals (Bradford, 1976):**

Es quantificà la concentració de proteïnes totals en els músculs MC, DG i TA, i en el plasma. Per ambdós casos s'utilitzà el mètode Bradford (1976).

Per a la quantificació de proteïnes totals en músculs, es feu servir el mateix protocol i medi d'homogeneïtzació que per a les anàlisis enzimàtiques de LDH i CS. Tant en les mostres com en la recta patró es feren duplicats i de cada duplicat s'efectuà més d'una lectura. Després del temps d'incubació que marca el protocol, es llegiren les mostres a l'espectrofotòmetre de plaques Labsystems iEMS Reader MF (Finlàndia) amb el software corresponent (Genesis Labsystems versió: 2.16) a $\lambda = 620\text{nm}$.

De les alíquotes de plasma congelades, una part s'utilitzaren per quantificar tant les proteïnes totals com el contingut de la proteïna fibrinogen en plasma (Vegi's apartat següent). En aquest cas també s'utilitzà el mètode de Bradford (1976) tot i que aquest cop s'utilitzà el Reactiu de Bradford ja comercialitzat per Bio Rad (*Protein assay reagent, Bio Rad*). Com a estàndard i per crear la recta patró, s'utilitzà albúmina sèrica bovina estàndard (BSA). Tant per les mostres com per la recta patró es feren duplicats i de cada duplicat s'efectuaren 15 lectures. Es llegí a 595nm en un espectrofotòmetre de plaques TECAN Infinite 200 (Grödig-Salzburg, Asutria).

La determinació del contingut total de proteïnes en les diferents mostres estudiades, ens permetrà avaluar correctament els canvis que es donguin en els estudis d'activitats enzimàtiques, contingut cel·lular sanguini i en la concentració de Mb/albúmina. Sense conèixer el contingut d'aquestes, no podríem estar en la certesa que els resultats dels paràmetres estudiats fossin correctes degut a la possibilitat d'interferència de l'activitat proteica.

• **Quantificació de fibrinogen (Rampling & Gaffney, 1976):**

Es quantificà el fibrinogen en plasma seguint el mètode descrit per Rampling & Gaffney (1976). Aquest mètode es basa en la precipitació del fibrinogen induïda pel sulfat sòdic, compost utilitzat per primera vegada per Goodwin (1965). Tant de les mostres com de la recta patró es feren duplicats i de cada duplicat s'efectuaren 15 lectures. Aquestes lectures de densitat òptica es feren utilitzant un espectrofotòmetre de plaques TECAN Infinite 200 (Grödig-Salzburg, Asutria) a una $\lambda = 280\text{nm}$. La relació entre l'absorbància mesurada i la concentració de fibrinogen de la mostra original de plasma és: $DO_{\text{mesurada}} \cdot 30,6 = \text{Fibrinogen en mostra (mg/mL)}$. Els resultats foren expressats com a (mg Fibrinogen) / (100ml de plasma).

3.3.2.6. Indicadors d'estrès oxidatiu

Per tal de valorar l'efecte de l'estrès oxidatiu que produïa el nostre programa HHI, es quantificaren els nivells dels enzims catalasa (CAT) i superòxid dismutassa (SOD) en hematies, i TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*) en plasma.

Primer de tot, es procedí a la descongelació del plasma obtingut de cada un dels animals per tal d'analitzar el contingut de TBARS, un dels paràmetres quantificadors de la peroxidació lipídica més usats en la literatura.

També es descongelaren els hematies, els quals havien estat congelats en tubs sense heparinitzar (així s'evita que l'heparina litiada interfereixi en els resultats) i en els quals s'hi afegí 1 μl de BHT (*butylated hydroxytoluene*, 1mmol en metanol, 1 μl per cada ml d'homogeneïtzat d'hematies). D'aquesta manera s'evita que la descongelació produeixi el trencament de molts eritròcits i es perdin al medi diferents enzims i molècules necessaris per a una correcta quantificació dels enzims CAT i SOD.

• **TBARS:**

L'MDA (malonildialdehid) és un ROS que apareix de forma natural i és alhora un producte final en els processos de lipoperoxidació. El fonament de la tècnica es basa en determinar la quantitat de compost orgànic MDA contingut en la mostra de plasma produït per la peroxidació lipídica, el qual reacciona amb el TBA (àcid tiobarbitúric). En la recta patró i en les mostres, es pot observar una coloració fluorescent ataronjada-rosada quan l'MDA reacciona amb el TBA. Com més gran és el contingut de lípids de la mostra biològica usada, més gran serà la reactivitat amb el TBA ja que es produeix una amplificació de la resposta al produir-se peròxids durant el test. Com més gran sigui el contingut en antioxidants a la mostra, més baix serà el nivell d'MDA.

El protocol utilitzat es basa en el mètode de Yagi (1984). Per a la valoració, s'utilitzà un espectrofotòmetre de plaques Labsystems iEMS Reader MF (Finlàndia), amb el software Genesis Labsystems versió 2.16 a 540-620nm. Malgrat ser un dels indicadors d'estrès oxidatiu més usats, la tècnica dels TBARS no és específica per l'MDA, i la peroxidació lipídica no és l'única font d'MDA (Vollaard et al., 2005). En primer lloc, diversos aldehids de l'MDA poden formar substàncies cromògenes. En segon lloc, una gran part de l'MDA mesurat es forma en la descomposició dels lipoperòxids durant l'etapa d'ebullició a pH àcid (sobre tot si no s'han pres precaucions agregant un quelant de ferro i un antioxidant durant l'ebullició). A més a més s'ha de tenir en compte que, en el cas de fluids humans, moltes substàncies químiques com els pigments biliars o les glicoproteïnes, poden donar falsos positius (Santos et al., 1980).

• **CAT:**

La CAT eritrocitària és un enzim antioxidant molt comú trobat en els organismes vius, i la seva funció inclou la catalització de la descomposició del

peròxid d'hidrogen en aigua i O_2 ($2 \cdot H_2O_2 \rightarrow 2 \cdot H_2O + O_2$). És un dels enzims més importants participants en la detoxificació de l' H_2O_2 (Sureda et al., 2005). Té una de les taxes més altes de *turnover* de tots els enzims. Una sola molècula de CAT pot convertir 5 milions de molècules de peròxid d'hidrogen a aigua i O_2 cada minut. Aquest enzim és un tetràmer de quatre cadenes polipeptídiques amb 4 grups hemo-porfirin, els quals permeten la reacció amb el peròxid d'hidrogen. El seu paper en els organismes és molt important, ja que el peròxid d'hidrogen que es forma com a producte de rebuig del metabolisme en diversos organismes vius, és altament tòxic i ha de ser convertit ràpidament en d'altres productes químics menys perillosos (Margaill et al., 2005). L'alta activitat de l'enzim CAT permet resoldre aquest problema catalitzant ràpidament la descomposició del peròxid d'hidrogen.

L'activitat de la CAT fou determinada com el consum d' H_2O_2 mesurat com el descens en l'absorbància a 240nm. El mètode analític utilitzat fou el d'Aebi (1983). Per a la valoració s'utilitzà un espectrofotòmetre Spectronic Genesys 2 (Miton Roy Company, USA). Els resultats obtinguts sempre foren corregits per la concentració d'Hb de la mostra utilitzant el reactiu Drabkin (Gámez et al., 2008).

• **SOD:**

L'enzim SOD és un dels enzims detoxificadors primaris i catalitza la dismutació del superòxid a O_2 i peròxid d'hidrogen (Metin et al., 2003). El superòxid, és un dels ROS més importants en la cèl·lula i és l'inici de la ja comentada reacció de Haber-Weiss (Margaill et al., 2005). L'enzim SOD representarà una significant defensa antioxidant en gairebé totes les cèl·lules exposades a O_2 .

El protocol utilitzat per la determinació de l'enzim SOD es basà en l'obtenció del pendent d'autooxidació del pirogalol (antioxidant) específic per a cada dosi de mostra (el pendent disminuirà en presència de SOD) (Marklund,

1985). S'utilitzà un espectrofotòmetre de plaques Labsystems iEMS Reader MF (Finlàndia), amb el software Genesis Labsystems versió 216 a 414nm. Els resultats obtinguts sempre foren corregits per la concentració d'Hb de la mostra utilitzant el reactiu Drabkin (Gámez et al., 2008).

3.4. Anàlisi estadístic

Totes les dades es presenten agrupades en els quatre grups experimentals corresponents a les 4 condicions explicades anteriorment: C, H, P20 i P40. En els paràmetres estudiats no s'han trobat diferències significatives entre els diferents grups control (Control 1, Control 2 i Control 3). Per la qual cosa, quan parlem de Control, ens referirem al conjunt dels 3 grups control agrupats.

Els resultats foren expressats com la mitjana aritmètica \pm error estàndard. Per a la prova de la normalitat s'usà el test de Kolmogorov-Smirnov amb la correcció de Lilliefors. Les comparacions entre els grups experimentals i el grup C es van determinar mitjançant l'anàlisi de variància (ANOVA) d'una via. Prèviament a l'anàlisi ANOVA, la funció *arcsinus* s'emprà per estudiar el percentatge de tipus de fibra. S'utilitzà el mètode de Scheffé o Holm-Sidak de múltiples comparacions, per determinar les possibles variacions entre cada parell de condicions experimentals. Tots els estadístics foren realitzats amb el programa estadístic SPSS/PC+ (SPSS Inc.) i amb el programa Sigma Stat software package (SYSTAT Software, Erkrath, Germany). Es van considerar diferències significatives valors de $p < 0,05$.