

## ***DISCUSIÓ CONJUNTA***



En la present tesi doctoral s'ha estudiat en una primera fase el funcionalisme mitocondrial i el dany oxidatiu produïts pel fum del tabac, doncs existia una alta sospita que aquestes interaccions es produïen. A més, en una segona fase s'ha estudiat el funcionalisme mitocondrial i el dany oxidatiu produïts pel CO, donat que aquest gas tòxic contingut al fum del tabac havia estat proposat com a possible responsable de les alteracions trobades en aquest sentit en fumadors. Finalment, en una tercera fase, s'ha estudiat l'efecte específic del CO envers la CRM en absència d'altres factors de confusió mitjançant un model experimental *in vitro*.

Fins a la realització dels estudis presentats, hom sabia que el fum del tabac, compost per més de 4000 substàncies diferents, constitueix una font exògena de molècules d'alta capacitat oxidativa, i també augmenta la producció endògena d'aquestes molècules (ref.44,45,46,47,48,49) derivant en dany oxidatiu de proteïnes estructurals i enzims, lípids i DNA, cosa que ja havia estat abastament demostrada (ref.50,52,53,54,55,56). Aquest dany oxidatiu del DNA sempre ha estat considerat de crucial rellevància com a mecanisme involucrat en la patogènia de la carcinogènesi (ref.54,57,58,59). A més, alguns autors defensaven que el propi mitocondri podia ser també una diana del dany oxidatiu (ref.60), alterant proteïnes estructurals i enzims, lípids de membrana i mtDNA (ref.61,62), conduint a una disminució de la producció energètica (ref.63), i fins i tot a la mort cel·lular (ref.60,64,65). Aquesta podia ser una contribució del mitocondri addicional a altres mecanismes de lesió cel·lular induïts pel tabac, però de totes formes, quedava per aclarir la possible interferència de la cadena respiratòria mitocondrial per algun o alguns components del tabac, apuntada per alguns estudis *in vitro* i *in vivo* en animals (ref.72,69,71,43,76,77), éssent els estudis en humans escassos i no conclouents (ref.74,75,70). Donat que el

mitocondri és de forma natural una font endògena d'espècies reactives de l'oxigen fruit de la gran quantitat de reaccions redox (ref.63), la disfunció mitocondrial, de donar-se, podia implicar un trastorn de la funció cel·lular amb augment de l'estrès oxidatiu, i d'aquesta manera contribuir en cert grau a la fisiopatologia de les malalties relacionades amb el tabac.

El primer treball d'investigació demostra que en els limfòcits dels fumadors existeix una inhibició de la citocrom *c* oxidasa (COX), complex IV de la cadena respiratòria mitocondrial (CRM), i una activació de l'oxidació dels substrats que entren a la CRM a través del complex II, així com un augment en la peroxidació lipídica de les membranes limfocitàries respecte a una població d'iguals característiques però no fumadora.

L'alteració del funcionalisme mitocondrial trobada concorda amb els treballs realitzats prèviament per altres autors en animals (ref.69,77,71,76) i en humans (ref.74,75). L'augment d'activitat oxidativa, anunciada per algun autor de forma indirecta (ref.43), podria actuar com a mecanisme compensatori de forma similar al que succeeix en diverses malalties mitocondrials (ref.120).

L'augment de la peroxidació lipídica de membranes concorda també amb els estudis que demostraven un augment del dany oxidatiu en fumadors (ref.50,52,53,54,55,56). A més, la seva correlació amb les alteracions de la CRM permet hipotetitzar que la pròpia disfunció mitocondrial contribueix directament en l'increment de l'estrès oxidatiu, tancant-se d'aquesta forma un cercle viciós on la conseqüència nodreix la causa. En qualsevol cas sembla clar que la presència d'alteracions importants a la CRM en fumadors podria participar en els processos d'estrès oxidatiu que presenten, i de retruc, en la gènesi d'algunes malalties relacionades amb el tabac.

El segon treball d'investigació pretenia comprovar la reversibilitat de les alteracions trobades en fumadors en eliminar el tòxic, fent així un paral·lelisme del tabaquisme amb altres intoxicacions. Els resultats demostren que la inhibició de l'activitat COX en els limfòcits de fumadors és reversible, alhora que es constata una disminució de l'activitat oxidativa cel·lular espontània. La inhibició del complex IV corrobora les dades del treball previ, tot i que en aquest treball també hi trobem una lleugera disminució de l'activitat del complex III. La disminució d'altres complexos, a més del IV, ja ha estat referida per altres autors (ref.69,71,72,43), apuntant que potser l'alteració subjacent és una inhibició dels citocroms (ref.72). Això permet especular sobre les possibles substàncies implicades en aquestes inhibicions, que donat el tipus d'afinitat plantejada podria ser el monòxid de carboni (ref.94).

No obstant, la troballa més interessant en aquest treball és la reversibilitat de la inhibició de la COX en deixar de fumar. Tot i que les alteracions mitocondrials són potencialment reversibles, no es pot descartar que pugui persistir el dany oxidatiu secundari a una inhibició de la funció mitocondrial perllongada en el temps.

Com que en els fumadors crònics sovint hi coexisteixen altres factors derivats del fet de fumar, com ara malalties pulmonars més o menys desenvolupades, el tercer treball d'investigació anava dirigit a avaluar els possibles efectes del fet de fumar envers la cadena respiratòria mitocondrial en persones no fumadores. Així, si es podien reproduir d'alguna manera els efectes observats en fumadors crònics, es comprovaria que és el fum del tabac realment i no altres factors col·laterals del tabaquisme el que produeix les alteracions descrites prèviament en el funcionalisme mitocondrial dels fumadors. Els resultats d'aquest estudi demostren una inhibició de l'activitat COX en limfòcits circulants humans, que és

reversible a les 24h de no consumir tabac. Una vegada més concorda amb les dades d'altres autors (ref.69,74), però també amb les dades obtingudes en els treballs previs, donant consistència a aquesta inhibició de la COX.

La disminució de l'oxidació per diferents substrats observada immediatament després de fumar, contrasta amb l'augment de l'activitat oxidativa espontània cel·lular a les 24h més tard, quan tots els paràmetres s'han normalitzat. Aquesta dada indicaria que existeix algun tipus de mecanisme compensatori o bé seria una mesura falsejada per una oxidació no enzimàtica.

La manca de canvis en el dany oxidatiu analitzat a través de la peroxidació lipídica de membranes contrasta amb les diferències trobades en els fumadors crònics. Es pot interpretar com a una insuficient exposició en temps i/o en quantitat de tabac en el grup estudiat, o bé com a un correcte mecanisme de protecció per part dels antioxidants en aquestes persones que no són fumadores habituals.

Resumint aquesta primera part de la tesi, podem afirmar que **el fum del tabac per sí mateix altera la CRM, principalment a nivell de l'activitat de la COX**. En base a tot el que s'ha comentat, es podria dir que el que es produeix és una alteració crònica de la COX, amb o sense participació d'altres complexos. Altres factors relacionats amb el tabaquisme com la hipòxia, dèficits vitamínics i d'antioxidants i altres substàncies tòxiques, inclosos els propis radicals lliures, podrien contribuir a una alteració més o menys mantinguda de la CRM, en funció del temps del consum de tabac.

La lesió cel·lular última secundària a l'alteració crònica de la CRM dependria d'una banda de la seva exposició al tòxic i per una altra dels seus requeriments energètics. Així en els teixits altament exposats al fum del tabac, com ara els de les vies respiratòries, podria

explicar una disfunció ciliar en l'epiteli bronquial, una menor activitat dels macròfags alveolars i fins i tot una contribució a la carcinogènesi broncopulmonar (ref.121,122). A més a més, en els teixits altament dependents del metabolisme energètic (cervell, cor i muscle) podrien veure's afectades les seves funcions secundàriament a la disfunció mitocondrial (ref.90,69,71,123,74,75). Finalment, altres factors hipòxics relacionats amb el tabac, com ara la formació de COHb, l'esdeveniment d'una malaltia pulmonar crònica, o d'una isquèmia per arteriopatia, també podrien contribuir a la disfunció mitocondrial (ref.42).

En qualsevol cas, creiem que el fum del tabac per sí mateix és responsable d'alteracions a la cadena respiratòria mitocondrial, principalment a nivell de la COX. Les conseqüències a llarg termini d'aquestes alteracions podrien contribuir d'alguna manera a la fisiopatologia de les malalties relacionades amb el tabac.

Pel que fa a la substància o substàncies responsables dels efectes mitocondrials observats en relació al consum de tabac, el monòxid de carboni (CO) n'és un bon candidat, donada la seva afinitat per molècules que contenen el grup *heme* (ref.78,79,80,81), com la hemoglobina (ref.85), la mioglobina, el citocrom P-450 i el citocrom  $a_3$  (ref.94). Aquest últim constitueix el grup prostètic de la COX i podria explicar la seva alteració en presència de CO (ref.88,90,91,95,96,97). Però, així com els efectes de la unió del CO amb l'hemoglobina han estat molt estudiats, no és el cas dels efectes de la seva unió amb la COX. De fet, els esforços investigadors (ref.91,95,96,97,101) s'han dirigit a intentar esbrinar si participa en la simptomatologia de la intoxicació per CO que no es pot explicar per la formació de COHb (ref.88,81,84).

Alguns autors havien descrit una alteració de la COX en relació al fum del tabac (ref.74,75,69,77,43), dades que concorden amb els estudis presentats en aquesta tesi. D'altra banda un estudi preliminar del nostre grup de recerca (ref.92) mostrava també una inhibició de la COX en limfòcits de pacients intoxicats per CO. Malgrat els teixits diana principals serien aquells amb alta dependència energètica (cervell, cor i múscul), l'anàlisi de funcionalisme mitocondrial en limfòcits de sang perifèrica suposa una prova molt menys invasiva, i donat els resultats preliminars (ref.92) se'l va considerar un bon model per a l'estudi dels efectes tòxics del CO envers la CRM en humans.

En primer lloc, calia comprovar que en pacients intoxicats de forma aguda per CO és possible detectar una inhibició de l'activitat de complexos amb citocroms, i que aquesta inhibició té repercussió en el funcionalisme global de la cadena respiratòria mitocondrial i fins i tot produir un increment del dany oxidatiu. Els resultats dels treballs quart i cinquè presentats en aquesta tesi, mostren una inhibició dels complexos amb citocroms dels limfòcits de sang perifèrica de pacients intoxicats per CO, principalment la COX, juntament amb una disminució de l'activitat oxidativa, que van recuperant progressivament els dies següents. Així, mostren un augment del dany oxidatiu que també millora amb el temps.

El que fa interessants aquests estudis no és només la comprovació de l'alteració mitocondrial pel CO, sinó la persistència d'aquesta malgrat la normalització de la COHb i més enllà del que caldria esperar si aquestes alteracions fossin secundàries només al procés d'hipòxia (ref.124). Això reforça la idea que la inhibició de la COX es produeix per la unió del CO amb el citocrom  $a_3$  (ref.94). Es curiós, no obstant, que l'alteració persisteixi malgrat l'oxigenoteràpia i això fa pensar que o bé l'arribada de l'oxigen als teixits no és homogènia, o bé que la terapèutica només està basada en la normalització de la COHb. El fet de que repetides sessions d'oxigenoteràpia hiperbàrica disminueixin la incidència de la síndrome



neurològica tardana en pacients intoxicats per CO amb nivells de COHb relativament baixos (ref.125,126), recolzen aquesta hipòtesi.

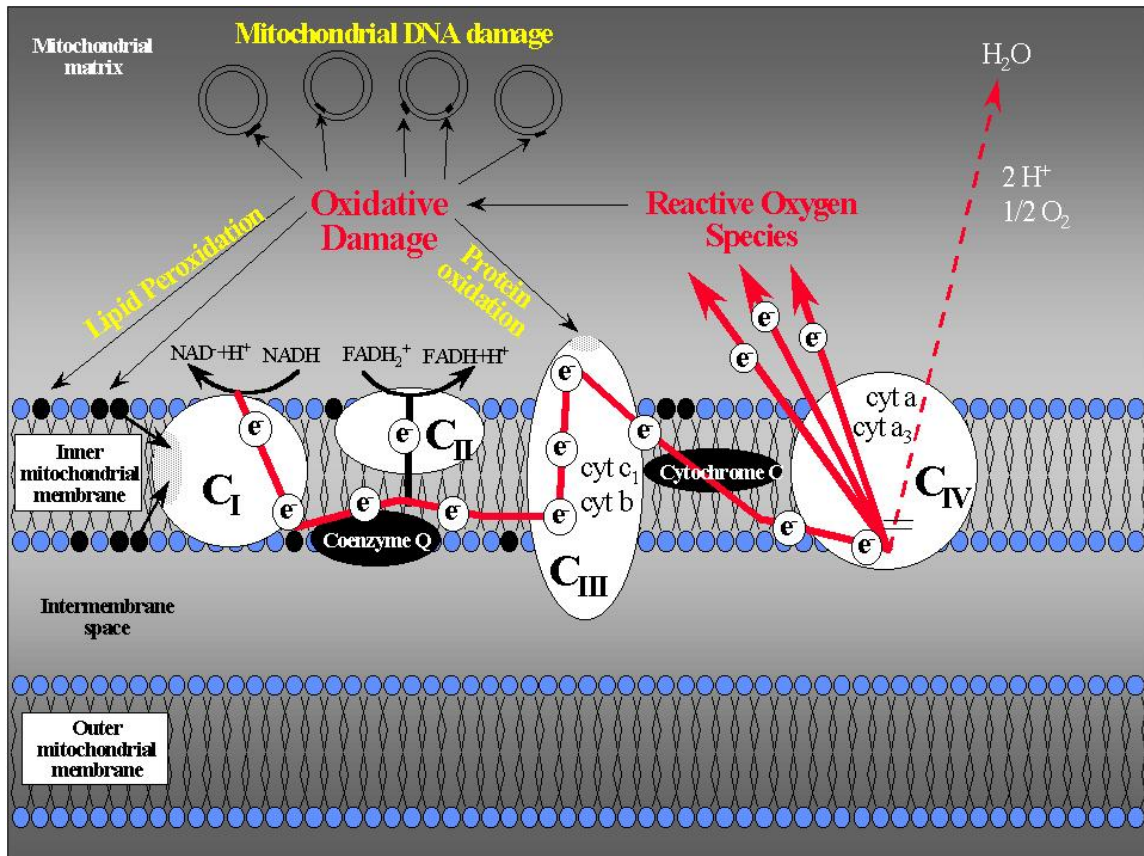
L'augment de dany oxidatiu mesurat a través de la peroxidació lipídica de membranes limfocitàries, tot i que és present en els dos treballs presentats, només resulta significatiu en un d'ells. Segurament, doncs, la presència de majors o menors alteracions degudes a l'augment de l'estrès oxidatiu, podria dependre de la magnitud de l'intoxicació (en temps d'exposició i/o en concentració de CO al que s'ha estat exposat).

A més, el fet de que aquests treballs hagin estat realitzats amb limfòcits, poden subestimar les alteracions reals. Així, les neurones que són cèl·lules post-mitòtiques on el dany mitocondrial és més difícil d'eliminar, i que tenen una alta dependència energètica podrien patir-ne més les conseqüències. És doncs realista pensar que podrien presentar unes alteracions mitocondrials més importants, explicant així més dany oxidatiu, el qual podria ser la base per a explicar la síndrome neurològica tardana (ref.51,90).

En qualsevol cas, els efectes observats han estat molt similars a aquells que hem trobat en persones fumadores. Donat que el CO és un gas amb una presència important al fum del tabac (ref.78,79,80,81,99,100), aquest és un ferm candidat a ser un dels principals causants de les alteracions mitocondrials que presenten els fumadors crònics.

Tot el que s'ha exposat fins ara permet hipotetitzar un altre mecanisme d'afectació cel·lular per part del fum del tabac, a part dels mecanismes descrits arreu ja coneguts avui en dia. Seguint aquesta idea, el mitocondri hi podria jugar algun paper, probablement a través d'una alteració de la CRM principalment deguda a la interacció de la COX amb el CO contingut al fum del tabac, sense descartar però altres possibles interaccions addicionals per part d'altres components del fum del tabac. D'aquesta manera minvaria la capacitat de producció energètica cel·lular i d'altra banda augmentaria el dany oxidatiu de

la cèl·lula contribuint a la lesió cel·lular última, però endemés augmentaria el dany oxidatiu del propi orgànul conduint a un empitjorament de la disfunció mitocondrial, que fins i tot podria arribar a constituir un veritable cercle viciós de lesió mitocondrial (Figura 7).



**Figura 7.** Esquema proposat d'afectació mitocondrial pel CO a través de la seva interacció amb la COX. Una inhibició del complex IV prou important podria produir una alteració de l'activitat de la CRM disminuint la producció d'energia i incrementant l'estrès oxidatiu. El subseqüent augment del dany oxidatiu en el propi orgànul podria empitjorar la disfunció mitocondrial. Tot això i el dany oxidatiu produït fora l'orgànul contribuirien a l'alteració de la funció cel·lular, i en última instància, fins i tot, a la lesió cel·lular.

Finalment, amb l'ànim d'analitzar l'efecte específic del CO envers la CRM en absència d'altres factors de confusió, es va dissenyar un model experimental *in vitro*

d'intoxicació per CO. Es varen aïllar els mitocondris de mostres de múscul de voluntaris sotmesos a cirurgia de maluc i els vam sotmetre a aire i a concentracions creixents de CO. Els resultats d'aquest sisè treball presentat en aquesta tesi demostren clarament una inhibició de l'activitat COX en els mitocondris de múscul sotmesos a CO, més intensa quant més alta sia la concentració de CO, sense cap alteració de cap altre complex de la CRM. Donat que l'oxigen ha estat sempre present, la inhibició es pot atribuir a la unió del CO al citocrom  $a_3$  (ref.94). Una vegada més, aquesta troballa concorda amb els estudis realitzats en intoxicats per CO del nostre grup de recerca (ref.92), els presentats en aquesta tesi, i amb els estudis en fumadors d'aquesta tesi i els realitzats per altres autors (ref.74,75,69,77,43). La inhibició COX podria portar a una inhibició de tota l'activitat de transport electrònic de la CRM, disminuint la producció energètica que portaria a una disminució de la funció dels òrgans més energia-dependents (ref.127,128). D'altra banda, una alteració de la CRM prou intensa podria conduir a l'augment d'ERO (ref.51,90,92), com també demostrem en aquesta tesi.

No obstant, hi ha dues consideracions que fan impossible correlacionar aquests resultats *in vitro* amb el mateix procés *in vivo*. En primer lloc, l'absorció del CO *in vivo* depèn de la ventilació minut, les concentracions relatives de CO/O<sub>2</sub> en l'ambient, i del temps d'exposició (ref.129). En segon lloc, la distribució del CO una vegada absorbit depèn de la perfusió del teixit com qualsevol substància a l'organisme. A més, la sensibilitat del teixit és diferent d'acord amb la seva dependència energètica, i altres factors com la hipòxia deguda a COHb o lesions per malalties subjacents s'afegeixen en l'organisme.

En tot cas, el que sí podem deduir d'aquestes segona i tercera part de la tesi és que **el CO actua inhibint la COX dels mitocondris humans.**

En conclusió, en la present tesi doctoral s'ha demostrat l'afectació del funcionalisme mitocondrial pel fum del tabac. Més concretament, s'ha demostrat que el monòxid de carboni per sí mateix és un tòxic pel mitocondri humà, alterant la cadena respiratòria mitocondrial a nivell de la citocrom *c* oxidasa, complex IV de la cadena respiratòria mitocondrial. Aquesta inhibició podria jugar algun paper en la intoxicació per CO i en les malalties relacionades amb el tabaquisme.