

## 4.1. Dissenys experimentals

### Estudi 1

L'estudi es va realitzar en 215 pacients homes que havien patit un infart de miocardi. Per escollir els participants es van utilitzar els criteris de selecció de l'Organització Mundial de la Salut. Els pacients es van reclutar al Servei de Medicina Interna de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus i a la Unitat de Medicina Interna de l'Hospital Joan XXIII de Tarragona. Les mostres de sang van ser recollides entre 3 i 4 mesos després de l'últim episodi agut.

Tots els procediments van estar d'acord amb els requeriments ètics de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus i l'Hospital Joan XXIII de Tarragona.

Com a grup control es van utilitzar 215 homes sans, procedents de revisions mèdiques rutinàries de diverses companyies de la mateixa àrea geogràfica i sense cap evidència clínica de malaltia cardiovascular. Aquests controls es van aparellar per edat ( $\pm 5$  anys) i índex de massa corporal ( $\pm 1.5$ ) amb els pacients.

Es va fer una revisió física a tots els participants, abans de començar l'estudi, per valorar el seu estat de salut general. En aquesta revisió es va valorar l'existència de diabetis, hipertensió, tabaquisme i també es va mesurar el pes i l'alçada de cadascú per calcular l'índex de massa corporal.

Es va realitzar una extracció sanguínia de cadascun dels participants després d'un dejuni de 8 hores i es van processar les mostres per obtenir-ne sèrum i ADN.

El sèrum es va guardar a  $-70^{\circ}\text{C}$  immediatament després d'obtenir-se i, més tard, s'hi van determinar:

- ✓ Les activitats paraoxonasa i arilesterasa.
- ✓ Les concentracions de colesterol total, triglicèrids i colesterol HDL mitjançant mètodes enzimàtics (ITC Diagnòstics, Barcelona, Espanya).
- ✓ Les concentracions d'apolipoproteïna (apo) A-I i apolipoproteïna (apo) B per immunoturbidimetria (Biokit, Barcelona, Espanya).

L'ADN genòmic es va obtenir a partir dels leucòcits i es van analitzar els polimorfismes PON1<sub>155</sub> i PON1<sub>192</sub> del gen *PON1* mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) i posterior restricció enzimàtica.

### Estudi 2

#### Estudi *in vivo*

L'estudi es va dur a terme en 120 rates Wistar, mascles i adultes (Panlab, Barcelona, Espanya). Els animals es van establir una setmana abans de començar l'experiment sota condicions estàndard de llum i temperatura (cicle de llum/fosc de 12 hores i 22 °C).

La meitat d'aquests animals (n=60) es van sotmetre a un protocol d'inducció de cirrosi hepàtica mitjançant l'administració intraperitoneal de CCl<sub>4</sub> i l'altra meitat van constituir el grup control. La inducció de cirrosi hepàtica va consistir en dues injeccions intraperitoneals de CCl<sub>4</sub> setmanals amb un interval de 4 dies i a una dosi de 0.5 mL de CCl<sub>4</sub>/kg de pes dissolt 1:1 en oli vegetal (76). Els animals control van rebre només oli vegetal en la mateixa dosi que les rates tractades.

Al començament de l'estudi els animals es van dividir en quatre grups segons el tractament i la dieta rebuda. Els grups resultants van ser els següents:

- **Grup A:** Rates control (n=30). Alimentades *ad libitum* amb una dieta estàndard que contenia un 60% de carbohidrats, un 25% de proteïnes, un 3% de greix i un 12% de sals i fibres (Purina Chow A03, Panlab, Barcelona, Espanya).
- **Grup B:** Rates control (n=30). Alimentades amb una dieta estàndard com el grup A i un suplement de zinc (227 mg/L de ZnSO<sub>4</sub>) dissolt a l'aigua de beguda.
- **Grup C:** Rates tractades amb CCl<sub>4</sub> (n=30). Alimentades amb una dieta estàndard com el grup A.
- **Grup D:** Rates tractades amb CCl<sub>4</sub> (n=30). Alimentades amb una dieta estàndard més un suplement de zinc al igual que el grup B.

Subgrups de 10 animals de cadascun d'aquests grups es van sacrificar per dessagnació sota anestèsia a les setmanes 1, 5 i 7 de tractament. La figura 9 mostra un esquema del processament de les mostres biològiques. Es va extreure sang de la vena cava inferior, es va centrifugar a 1000 g durant 10 min i es va congelar el sèrum alíquotat a  $-70^{\circ}\text{C}$  per a determinar-hi posteriorment l'activitat alanina aminotransferasa (ALT).

El fetge es va extreure, pesar i fraccionar en petites porcions (aproximadament d'uns  $200\text{ mm}^3$ ) que es van processar de la forma següent:

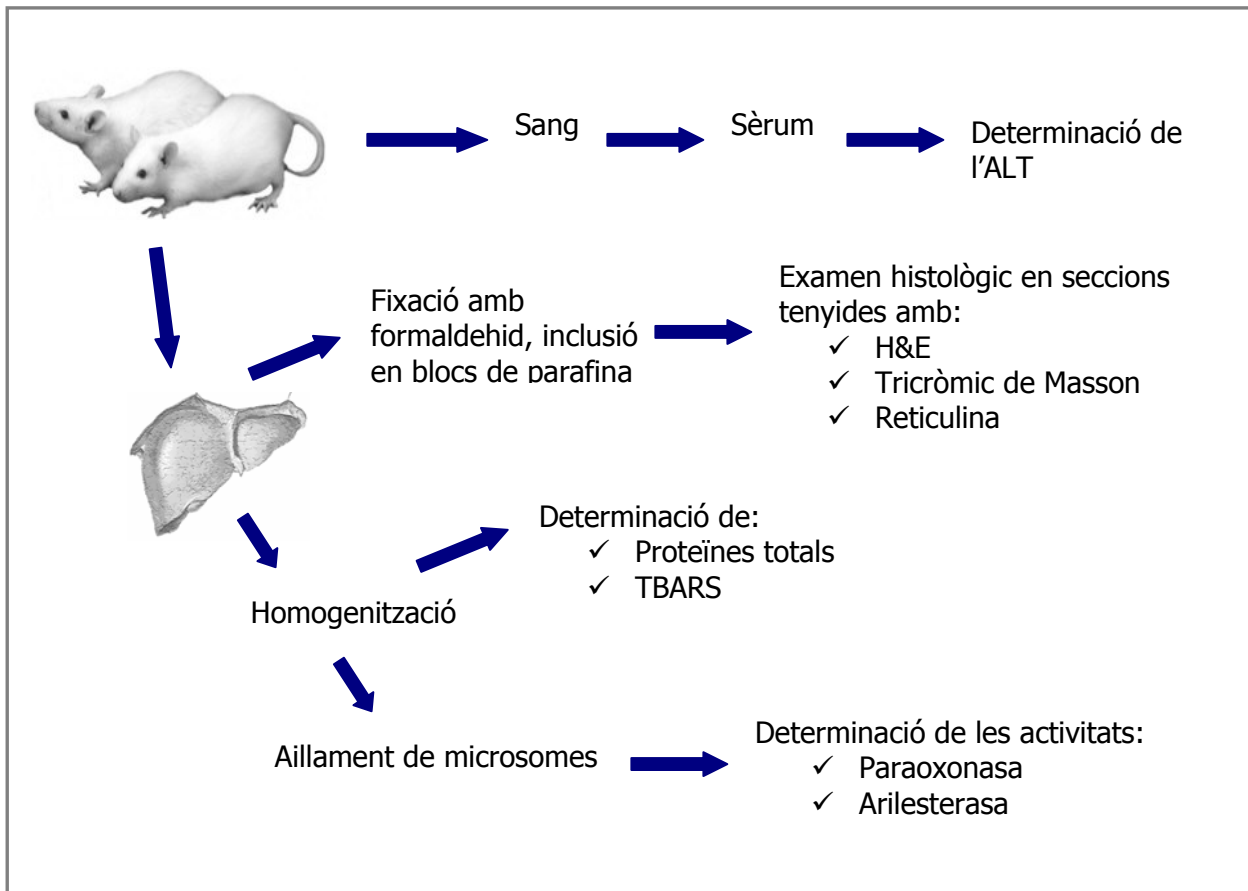
- ✓ Unes porcions es van fixar immediatament amb formaldehid 4%, es van embeure en parafina i es van incloure en blocs. Posteriorment es va realitzar un examen histològic amb seccions tenyides amb hematoxilina-eosina (H&E), tricròmic de Masson i reticulina.
- ✓ Una part es va homogenitzar al 10% (p/v) amb tampó Tris-HCl 50 mM, KCl 150 mM (pH=7.4) amb un homogeneitzador Potter-Elvehem i un èmbol de teflò. En aquest homogenat es va determinar la concentració de proteïnes mitjançant la tècnica colorimètrica del vermell de Pirogalol (ITC Diagnostics, Barcelona, Espanya). També es va mesurar en l'homogenat hepàtic la producció de lipoperòxids (bàsicament malonildialdehid (MDA)) mitjançant la tècnica de les substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric (TBARS). Part de l'homogenat es van utilitzar per obtenir la fracció microsomal que es va guardar a  $-80^{\circ}\text{C}$  per determinar l'activitat paraoxonasa i arilesterasa.

### Estudi *in vitro*

Per tal d'investigar la possibilitat d'un efecte directe del  $\text{CCl}_4$  i el MDA en la inhibició de l'activitat PON1 microsomal es va dissenyar el següent experiment:

Microsomes hepàtics obtinguts a partir del fetge d'una rata control es van incubar durant 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$  en presència de  $\text{CCl}_4$  (9, 27 i 81 mM) o de MDA (15, 45 i 135  $\mu\text{M}$ ). Posteriorment es va determinar l'activitat PON1. El medi d'incubació contenia 5 mM Tris, 0.1 mM ATP, 0.1 mM NADPH i un sistema regenerador de NADPH que consistia en 1 mM de glucosa-6P, 2 U de glucosa-6P-deshidrogenasa i 120 mM de KCl. Tots els experiments es van fer per triplicat.

**Figura 9:** Esquema del processament de les mostres biològiques del protocol *in vivo* de l'estudi 2.



### Estudi 3

Aquest estudi es va realitzar amb una mostra de 175 pacients amb patologia hepàtica crònica recollits del dispensari clínic de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus. L'estudi va incloure 68 pacients amb cirrosi hepàtica (42 homes i 26 dones; edat:  $60 \pm 10$  anys) i 107 pacients amb hepatitis crònica (69 homes i 38 dones; edat:  $46 \pm 14$  anys). L'hepatitis crònica va ser diagnosticada per biòpsia hepàtica i en un 73% dels casos era secundària a la infecció del virus de l'hepatitis C. La cirrosi hepàtica es va diagnosticar en funció de les evidències clíniques, que incloïen l'esplenomegàlia i la dilatació de les venes portals avaluades per ecografia, i la presència de varius esofàgiques detectada per fibrogastroscòpia.

El grup de control va consistir en 368 voluntaris sans que participaven en un estudi epidemiològic que es duia a terme en la nostra regió i que es correspon amb l'acrònim d'HOMFOL. Els participants (182 homes i 186 dones; edat:  $42 \pm 15$  anys) eren ostensiblement sans i sense evidències clíniques o analítiques de diabetis, neoplàsia, malaltia renal, dany hepàtic o malaltia cardiovascular.

Es va realitzar una extracció sanguínia de cadascun dels participants després d'un dejuni de 8 hores i es van processar les mostres per obtenir-ne sèrum i ADN.

El sèrum es va guardar immediatament després d'obtenir-se a  $-70^{\circ}\text{C}$  i més tard s'hi va determinar:

- ✓ L'activitat paraoxonasa
- ✓ Les activitats alanina aminotransferasa (ALT),  $\gamma$ -glutamil transferasa (GGT) i fosfatasa alcalina (FAL) mitjançant mètodes enzimàtics (ITC Diagnostics, Barcelona, Espanya).
- ✓ Les concentracions de proteïnes totals, albúmina i bilirrubina mitjançant mètodes enzimàtics (ITC Diagnostics, barcelona, Espanya).

L'ADN genòmic es va obtenir a partir dels leucòcits i es van analitzar els polimorfismes PON1<sub>55</sub> i PON1<sub>192</sub> del gen *PON1* mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) i posterior restricció enzimàtica en tots els participants.

## 4.2. Mètodes

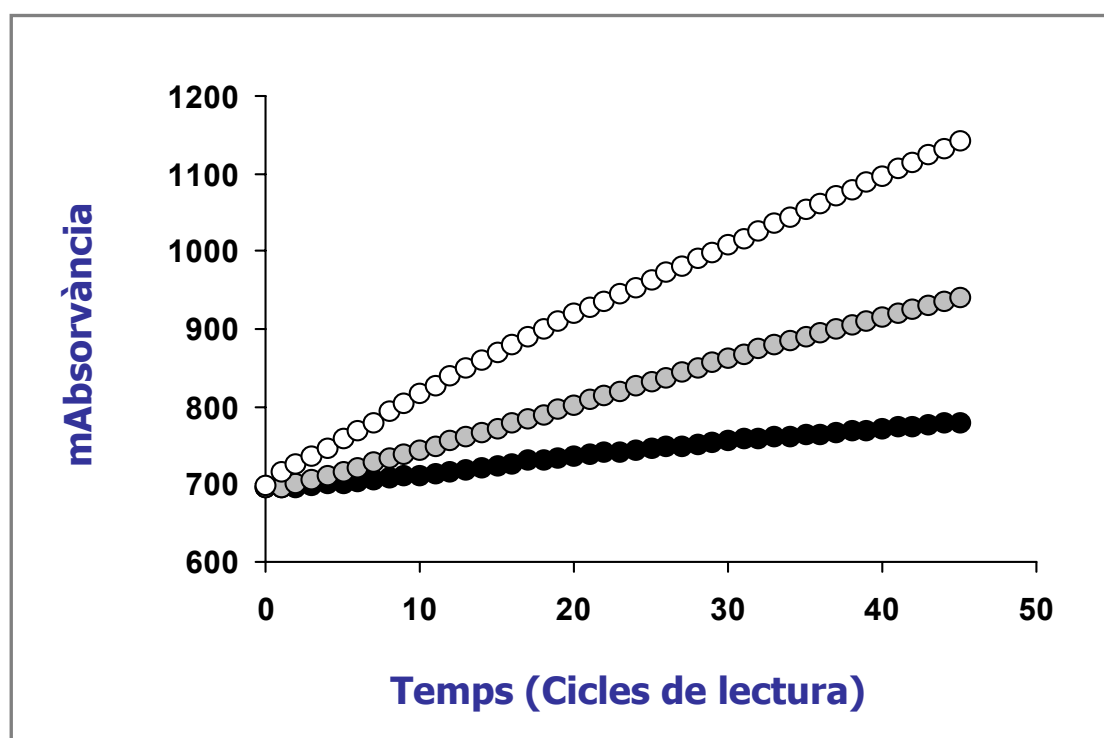
### Determinació de l'activitat paraoxonasa

Aquesta determinació es va fer mitjançant l'adaptació automàtica d'un assaig descrit prèviament (31). L'activitat PON1 es va mesurar sense presència de clorur sòdic addicional (activitat basal) i en presència d'1 M de NaCl en el tampó d'assaig (activitat estimulada amb sal). El tampó de reacció contenia 1 mM de paraoxon >96% de puresa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), i 1mM de CaCl<sub>2</sub> en 0.05 M de tampó glicina (pH=10.5). El coeficient d'extinció molar del paraoxon a 410 nm és de 16900. Els assaigs es van realitzar en un analitzador automàtic Shimadzu 7200 (Instrumentation Laboratories, Milà, Itàlia) on 8  $\mu\text{L}$  de

mostra es van barrejar amb 250  $\mu\text{L}$  de tampó i es va mesurar la hidròlisi del paraoxon mitjançant la lectura de l'increment de l'absorbància a 410 nm i 37°C. L'absorbància del blanc no va ser mai més gran de 0.700. L'activitat paraoxonasa es va expressar en U/mL. Els coeficients de variació interassaig i intraassaig van ser de  $< 8\%$  i  $< 6\%$  respectivament.

La figura 10 mostra la cinètica de la reacció en tres mostres amb diferent activitat PON1 basal.

**Figura 10:** Cinètica de reacció de la mesura de l'activitat paraoxonasa basal en tres mostres corresponents als genotips QQ (punts negres), QR (punts grisos) i RR (punts blancs) per al polimorfisme PON1<sub>192</sub>.



### Determinació de l'activitat arilesterasa

La determinació de l'activitat arilesterasa es va realitzar mesurant la hidròlisi de fenilacetat en un espectrofotòmetre UVIKON 922 Kontron (Kontron Instruments, Zurich, Suïssa), monitoritzant l'increment d'absorbància a 270 nm i 25°C (30). En resum: 5  $\mu\text{L}$  de mostra es van dissoldre en 3 mL de tampó de reacció (dilució 1:601) que contenia 1 mM de fenilacetat, 9 mM de Tris/HCl pH=8 i 0.9 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Es va mesurar l'absorbància cada 6 s i es va calcular l'increment entre els 30 s i els 90 s. Es va restar l'absorbància del blanc en cada

mostra. El coeficient d'extinció molar del fenilacetat a 270 nm era de 1310. L'activitat arilesterasa es va expressar en KU/mL.

### Determinació dels polimorfismes PON1<sub>55</sub> i PON1<sub>192</sub> del gen *PON1*

L'ADN genòmic es va obtenir a partir dels leucòcits després de l'hemòlisi de sang total (Puregene DNA Isolation Kit, Gentra, Mineapolis, MN) i es van analitzar els polimorfismes PON1<sub>55</sub> i PON1<sub>192</sub> del gen *PON1* mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) i la posterior restricció enzimàtica. Els oligonucleòtids encebadors utilitzats es mostren a la taula 5.

**Taula 5:** Oligonucleòtids encebadors utilitzats per amplificar les regions dels polimorfismes PON1<sub>55</sub> i PON1<sub>192</sub>.

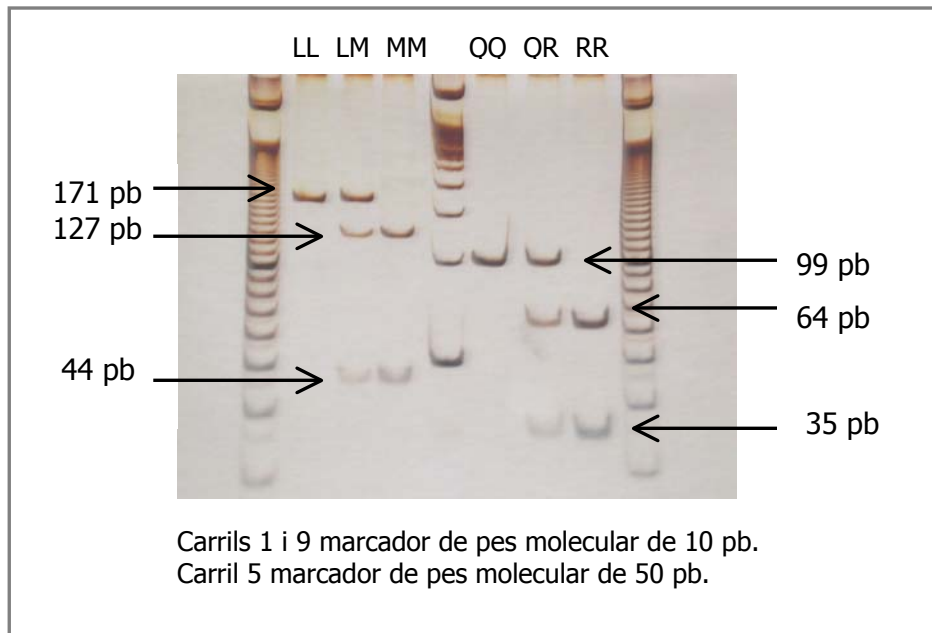
	Polimorfisme PON1 <sub>55</sub>	Polimorfisme PON1 <sub>192</sub>
Oligonucleòtid <i>sense:</i>	5'-gAAgAgTgATGTATAgCCCCAg-3'	5'-TATTgTTgCTgTggggACCTgAg-3'
Oligonucleòtid <i>antisense:</i>	5'-TTTAATCCAgAgCTAATgAAAgCC-3'	5'-CACgCTAAACCCAAATACATCTC-3'

El programa d'amplificació utilitzat va ser el següent:

94° C .....	90 s
<hr/>	
35 cicles de:	
94° C .....	30 s
61° C .....	30 s
72° C .....	30 s
<hr/>	
72° C .....	6 min
15° C .....	∞

Els productes de PCR obtinguts de 171 pb per al polimorfisme PON1<sub>55</sub> i 99 pb per al polimorfisme PON1<sub>192</sub>, es van digerir amb els enzims de restricció *NlaIII* i *AlwI* respectivament, es van separar en gels de poliacrilamida del 12% i els patrons de bandes es van visualitzar després de tenyir-se amb nitrat de plata. A la figura 11 podem observar els resultats dels patrons de bandes característics per als diferents genotips d'aquests polimorfismes. La lectura dels gels i la interpretació dels genotips la van fer dues persones per separat que, a més, desconeixien el grup al qual pertanyien les mostres.

**Figura 11:** Gel de poliacrilamida al 12% tenyit amb nitrat de plata amb el patró de bandes característic de cadascun dels genotips possibles per als polimorfismes PON1<sub>55</sub> i PON1<sub>192</sub>.



### Aïllament de microsomes hepàtics

Es va obtenir la fracció microsomal a partir de 10 mL d'homogenat hepàtic per ultracentrifugació en una ultracentrifuga Kontron (Kontron Instruments, Zurich, Suïssa) equipada amb un rotor TFT 45.6. El procediment utilitzat es resumeix en el quadre 3.

#### Quadre 3.

##### **Procediment d'aïllament de microsomes hepàtics:**

- Centrifugar l'homogenat a 11000 g 15 min a 4°C.
- Recuperar el sobrenedant i centrifugar-lo a 105000 g durant una hora.
- Resuspendre el precipitat amb tampó KCl 0.154 M, Tris-HCl 50 mM (pH 7.4) i tornar-lo a centrifugar a 105000 g durant 15 min a 4°C.
- Descartar el sobrenedant i resuspendre el precipitat amb un mínim volum de NaCl 0.9%.

### Determinació de la peroxidació lipídica

La peroxidació lipídica es va valorar en homogenats hepàtics mitjançant la determinació de substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric (TBARS) per espectrofotometria directa (69), tal



com s'indica en el quadre 4. És conegut que aquesta tècnica presenta una molt bona correlació amb la determinació realitzada per HPLC en rates tractades amb  $\text{CCl}_4$  (77).

#### Quadre 4.

##### **Procediment determinació de TBARS:**

- Barrejar 0.3 mL d'homogenat hepàtic al 10% (p/v) amb 4 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  12 N i 0.5 mL d'àcid fosfotúngstic 10% i agitar amb el vòrtex. Incubar 5 min a temperatura ambient.
- Centrifugar a 3000 rpm durant 10 min i descartar el sobrenedant.
- Resuspendre el precipitat amb 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  12 N. Afegir-hi 0.3 mL d'àcid fosfotúngstic i homogeneïtzar amb el vòrtex.
- Centrifugar a 3000 rpm durant 10 min i descartar el sobrenedant.
- Resuspendre el precipitat amb 4 mL aigua i afegir-hi 1 mL de reactiu TBA (àcid tiobarbitúric 67% barrejat 1:1 amb àcid acètic glacial). Agitar-ho amb el vòrtex.
- Incubar en un bany d'aigua a 100°C durant una hora.
- Deixar refredar i centrifugar a 3000 rpm durant 10 min a 4°C.
- Recollir el sobrenedant i llegir-ne l'absorbància a 532 nm.

Per extrapolar la concentració de TBARS de la mostra problema es va fer una recta patró amb una solució de 1,1,3,3-tetraetoxipropà a 5 nmol/mL. Les concentracions es van obtenir amb el següent càlcul :

$$[ ] \text{ nmol / mL mostra} = 5 \times (\text{Abs. Mostra/Abs. Estàndard}) \times 1/0.3$$

Es va tenir en compte el pas d'homogeneïtzació per expressar la concentració de lipoperòxids per grams de teixit fresc i calcular la concentració de proteïnes totals en la mostra inicial per tal d'expressar la concentració per grams de proteïna.

#### **Exàmen histològic de les mostres hepàtiques**

Els fetges dels animals inclosos en l'estudi 2 van ser analitzats histològicament. Després de fixar-los amb formaldehid al 4% i d'incloure'ls en blocs de parafina, es van fer seccions de 4  $\mu\text{m}$  que es van tenyir amb les tècniques d'hematoxilina-eosina (Quadre 5), tricròmic de Masson (Quadre 6) i reticulina (Quadre 7).

Les seccions tenyides amb H & E ens van permetre observar una visió histològica del conjunt de l'estructura del teixit o de l'arquitectura de la lesió.

El tenyiment amb tricròmic de Masson es va utilitzar per observar les fibres de col·lagen (bàsicament de tipus I) que es tenyeixen específicament.

Es va realitzar un tenyiment específic per visualitzar la trama de reticulina. Aquesta estructura presenta un col·lapse en la cirrosi hepàtica que permet observar els nòduls de regeneració.

### Quadre 5.

#### **Tenyiment hematoxilina-eosina:**

- Desparafinar i hidratar.
- Tenyir 6 min amb hematoxilina de Harris.
- Rentar amb aigua corrent uns 5 min.
- Rentar amb aigua destil·lada.
- Tenyir 20 s amb eosina.
- Rentar amb aigua destil·lada.
- Deshidratar i muntar.

### Quadre 6.

#### **Tenyiment tricròmic de Masson:**

- Desparafinar i hidratar.
- Fixar amb Bouin al microones a la mínima potència durant 5 min.
- Deixar refredar.
- Rentar amb aigua corrent fins que perdi el clor groc.
- Tenyir amb hematoxilina fèrrica de Weigert durant 10 min.
- Rentar amb aigua corrent i després amb aigua destil·lada.
- Tenyir amb tricròmic de Masson durant 13 min.
- Rentar amb aigua acètica al 0.5 % submergeint els portaobjectes 2 o 3 vegades (màxim 20 s).
- Rentar amb aigua corrent i després amb aigua destil·lada.
- Tenyir 7 s amb verd llum.
- Rentar amb aigua corrent.
- Deshidratar i muntar.

**Quadre 7.**

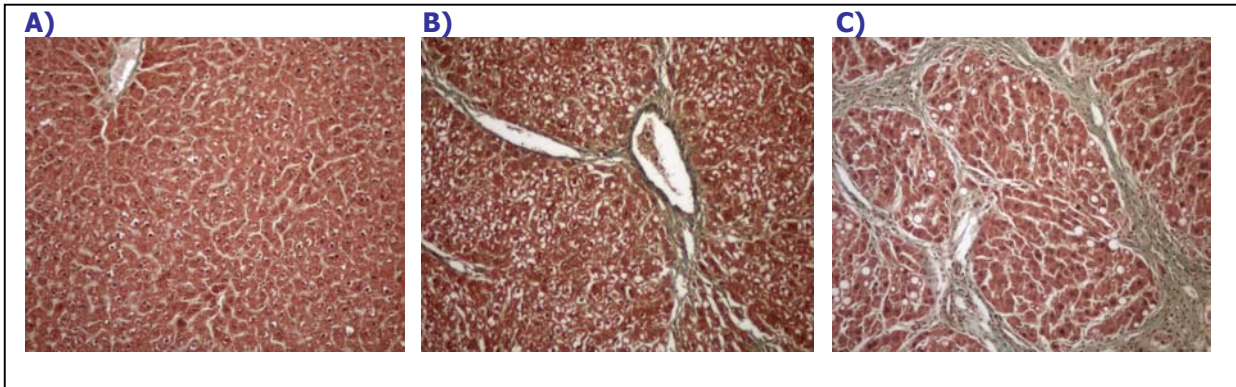
**Tenyiment de reticulina:**

- Desparafinar i hidratar.
- Fixar amb permanganat potàssic al 0.25% durant 5 min.
- Rentar amb aigua destil·lada uns 5 min.
- Incubar amb àcid oxàlic al 5% durant 3 min.
- Rentar amb aigua corrent i després amb aigua destil·lada.
- Tenyir 10 min amb plata amoniaca preparada en fresc. Breument: es barregen 0.5 mL d'amoniac pur amb 1 mL d'aigua destil·lada i després afegim gota a gota una solució de nitrat de plata al 10% fins que la solució agafi un aspecte tèrbol. Aleshores enrasar a 30 mL amb aigua destil·lada.
- Rentar amb aigua destil·lada.
- Fixar en formol a l'1% durant 5 min.
- Rentar amb aigua destil·lada.
- Tenyir amb clorur d'or a l'1% durant 5 min.
- Rentar amb aigua destil·lada.
- Incubar 2 min amb hiposulfit de sodi al 5%.
- Rentar amb aigua corrent.
- Tenyir amb eosina durant 24 s.
- Deshidratar i muntar.

Un patòleg, que desconeixia el grup de procedència de les mostres, va fer l'examen histològic de les seccions tenyides. Es van diferenciar tres categories:

- ✓ **Fetge normal** (Figura 12,a).
- ✓ **Fibrosi hepàtica:** Fetge amb un increment de l'acumulació hepàtica de col·lagen i formació més o menys important de septes fibrosos, però sense arribar a formar nòduls de regeneració (Figura 12,b).
- ✓ **Cirrosi hepàtica:** Fetge amb fibrosi i formació de septes fibrosos que delimiten nòduls de regeneració i, per tant, distorsionen àmpliament l'arquitectura i funcionalitat hepàtica (Figura 12,c).

**Figura 12:** Seccions de fetge tenyides amb tricròmic de Masson (100X), que es corresponen amb els diagnòstics de fetge normal (a), fibrosi hepàtica (b) i cirrosi hepàtica (c).



### 4.3. Anàlisi estadística

Totes les dades van ser analitzades amb el paquet estadístic SPSS/PC+ 10.0 i el programa Epi Info (CDC).

Es va aplicar el test de la  $Z$  de *Kolmogorov-Smirnov* per determinar si les variables presentaven una distribució normal. Les diferències entre grups es van analitzar amb la  $t$  de *Student* (test paramètric) o la  $U$  de *Mann-Whitney* (test no-paramètric). En alguns casos es va fer una transformació logarítmica de les variables que no presentaven una distribució normal.

Per comprovar el compliment de l'equilibri de *Hardy-Weinberg* i per analitzar les distribucions al·lèliques i genotípiques de pacients i controls es va utilitzar el test de la  $\chi^2$ .

Per valorar el grau d'associació de diverses variables amb la malaltia cardiovascular es va calcular l'Odds Ratio (OR).

El grau d'associació entre dues variables es va valorar amb el coeficient de correlació de *Pearson*.

Es va fer una anàlisi múltiple de la variança (MANOVA) per observar l'efecte de diverses variables en l'activitat PON1.

L'eficàcia diagnòstica de l'activitat PON1 i altres variables bioquímiques es va avaluar mitjançant l'anàlisi de corbes Receiver-Operating Characteristics (ROC) (78,79).

Es va fer una regressió logística múltiple per estimar la capacitat d'un grup de variables en predir la presència/absència de malaltia hepàtica.

Els resultats es van expressar com a mitjanes i desviacions estàndard. El grau de significació mínima es va establir en  $p < 0.05$  en cadascun dels tests.