



FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

“HIPÒXIA HIPOBÀRICA
INTERMITENT: APORTACIÓ PERIFÈRICA D’OXIGEN I
INDICADORS DEL METABOLISME MUSCULAR”

Memòria presentada per **Pere Panisello Tafalla** per optar al Grau de
Doctor per la Universitat de Barcelona

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. Ginés Viscor i Carrasco i del Dr. Joan Ramon Torrella i Guió del Departament de Fisiologia de Biologia. Adscrita al Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, programa Fisiologia (Bienni 2001-2003)

Ginés Viscor i Carrasco

Joan Ramon Torrella i Guió

Pere Panisello i Tafalla

Barcelona, 2006

1 INTRODUCCIÓ

*“El coneixement és un camí.
No un destí”.*

*Adaptació personal de la definició
japonesa de “Qualitat”.*

Passat, present i futur

Els primers estudis realitzats sobre els canvis fisiològics deguts a l'altura foren duts a terme pel fisiòleg francès Paul Bert a finals dels segle XIX (1878). En el seu tractat de quasi 1000 pàgines, "La Pression Barométrique" (Fig. 1.1), relaciona la disminució de la pressió baromètrica amb els canvis fisiològics i patològics provocats per l'altura (Kellogg, 1978), com a conseqüència de la reducció de la disponibilitat d'O₂.

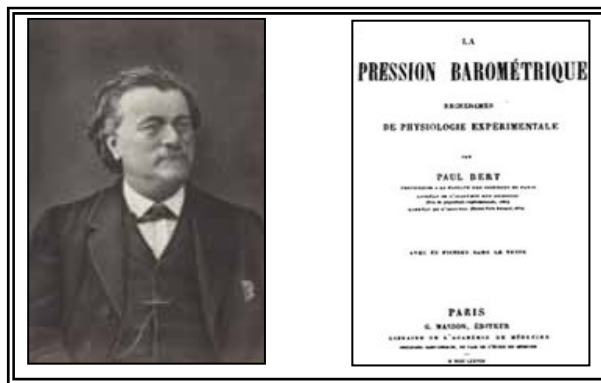


Figura 1.1. Paul Bert amb el seu tractat "La pression Barométrique".

Des d'aquells inicis fins als nostres dies s'han realitzat un gran nombre d'investigacions relacionades amb els canvis deguts a l'altura i a la hipòxia, des de nivell de l'organisme fins a nivell molecular (West, 1998).

En l'actualitat s'està produint un gran augment del nombre de persones que realitzen excursions per oci i que s'exposen a mitjana o gran altura. Exemples d'aquestes activitats són el muntanyisme, trekking, alpinisme, esquí, esquí extrem o expedicions també a mitjana i gran altura: Andes, Tibet, Himàlaia, Kenya, etc. (Askew, 2002).

Però no hem d'oblidar els més de 140 milions de persones que viuen, treballen i/o desenvolupen alguna activitat entre els 3.000 i els 5.500 metres d'altitud d'una manera regular i per descomptat, els 25 milions que hi viuen de manera permanent, sobretot est i sud-americà: altioplà andí, bolivià, mexicà, i a l'Àsia:

Afganistan, altiplà del Tibet, Pamir, Iran, Paquistà, Afganistà, l'est de Turquia, com a principals exemples (West, 2002).

D'aquí, entre d'altres motius que anirem mostrant, la gran importància que té conèixer els processos d'aclimatació i adaptació a l'altura com són: mecanismes de transducció de senyal, mecanismes moleculars, així com la importància de trobar possibles dianes i fàrmacs per a les diferents patologies associades amb la manca d'O₂ i d'altres que a simple vista no semblen tenir cap relació.

1.1 Què és la Hipòxia? Tipus

- La **Hipòxia**: és una disminució de la pressió parcial d'oxigen en fase gasosa o de la tensió d'aquest en fase líquida.

En situacions *normals* (normòxia) hi ha una relació equilibrada entre l'aportació d'oxigen i la demanda o necessitat d'aquest. En condicions d'*hipòxia* s'altera aquest *ratio*, havent-hi una menor disponibilitat d'O₂ sense presentar-se variacions en la demanda. Una altra situació inductora d'hipòxia és un augment de la demanda sense que canviï la disponibilitat d'O₂.

Depenent de les causes de la hipòxia, hi ha diferents tipus d'hipòxia:

1. **Isquèmica**: carència d'O₂ per disminució del rec sanguini en els teixits per motius fisiopatològics i/o quirúrgics, per exemple en casos d'insuficiència cardíaca. La pressió d'O₂ en els pulmons i la concentració d'hemoglobina són normals, però l'aportació d'O₂ als teixits és insuficient.
2. **Hipoxèmica**: disminució d'O₂ en la sang. Dins d'aquests grup podem trobar:

2.1 Hipòxia Hipobàrica: disminució de la pressió atmosfèrica (Fig. 1.2) malgrat que el percentatge d'O₂ en l'ambient és el mateix (20,9 %). Degut a que la pressió parcial d'O₂ en l'atmosfera es redueix en disminuir la pressió atmosfèrica ($p_{O_2} = P_{at} * \% O_2$) la diferència de

pressió entre els al·vèols i la sang venosa del capil·lar pulmonar minva i per tant, la pressió d'oxigen en la sang arterial decreix i l'aportació d'oxigen a les cèl·lules es veu disminuïda (Fig. 1.3).

2.2 Hipòxia Normobàrica: es produeix al respirar aire amb baixa proporció d'oxigen (el normal és 20,9 % d'O₂ en l'atmosfera).

3. Anèmica: reducció de la capacitat de fixació de l'O₂ per la sang degut a una alteració en el transport d'O₂, per exemple, per disminució de la concentració d'hemoglobina, del nombre d'eritròcits o per dèficit de ferro. O sense variar el nombre o concentració d'aquests, per alteració estructural (anèmia falciforme) o baixa funcionalitat. Per tant, en aquest cas no està involucrat l'ambient extern directament, ja que la pressió i concentració d'O₂ són les normals, sinó que és degut a problemes del propi organisme (encara que aquests poden ser causats per motius ambientals, com tòxics o contaminants).

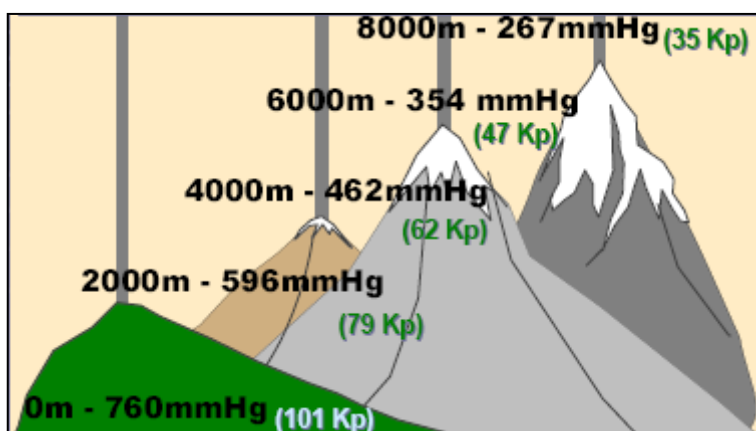


Figura 1.2. La pressió atmosfèrica és el pes de la columna d'aire que gravita sobre nosaltres i varia amb l'altitud. A més altura trobem pressions atmosfèriques menors. I a la inversa.

Depenent de la durada de l'exposició a la hipòxia podem tenir diferents tipus d'hipòxia:

- a) Aguda: es tracta d'una exposició sobtada i puntual a la hipòxia. Es posen en marxa ràpidament mecanismes reguladors (veure apartat 1.4 "*Mecanismes compensatoris*" pàg. 18) que impliquen sobretot al sistema nerviós.

- b) Crònica: es dona quan una exposició prolongada indueix una resposta d'acclimatació compensatòria.
- c) Intermitent: es produeixen cicles alternatius d'hipòxia i normòxia. En determinades ocasions s'intenta aconseguir els efectes de les acclimatacions cròniques, però amb una menor exposició hipòxica a l'organisme.

Dins de la hipòxia intermitent podem distingir 3 sub-divisions:

c.1) Hipòxia intermitent episòdica, hipòxia breu, que sovint passa inadvertida: vols regulars de llarga durada, activitats de risc a moderada i gran altura, apnea de la son, són alguns exemples.

c.2) Hipòxia intermitent periòdica, la hipòxia té una durada llarga (hores- dies i pot dependre del treball físic realitzat: expedicions d'ascens o travessies de muntanya ("trekking") a gran altitud.

c.3) Hipòxia intermitent crònica, es desenvolupa de manera regular, permanentment i al llarg del temps, com el que succeeix en els torns de treball a gran altitud (veure apartat 1.6.1.4 "Treball en altitud" pàg. 30).

Els estudis que són objectes d'aquesta Tesi, com detallarem més endavant, es basen en la hipòxia hipobàrica intermitent.

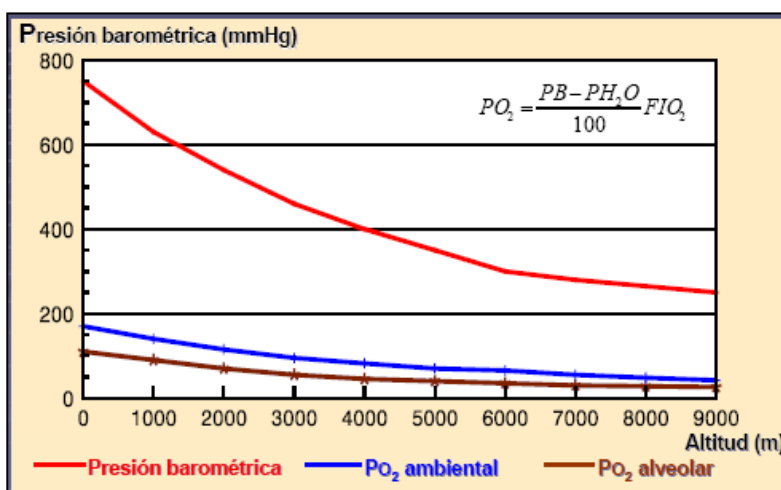


Figura 1.3. Disponibilitat d'O₂ en altitud. Al disminuir el gradient de pO₂ entre la P. ambiental i la P. alveolar, l'aportació d'O₂ a les cèl·lules es veu reduïda.

1.2 Mecanismes de regulació deguts a la hipòxia

Els organismes aeròbics, sobretot els vertebrats i mamífers, tenen la necessitat de mantenir l'homeòstasi de l'oxigen (Prabhakar, 2000). Cada cèl·lula, per sí sola, té la capacitat de detectar la falta d'oxigen i d'induir canvis en l'expressió de determinats gens. Com tots els sistemes integrats per diferents parts, a nivell de tot l'organisme també es desencadenen determinades modificacions per tal de retornar a l'equilibri oxidatiu.

D'aquesta manera, trobem un conjunt de cèl·lules especialitzades en detectar, directament o indirectament, una davallada en la pressió parcial d'oxigen (pO_2). Podem distingir 2 grans grups de cèl·lules detectores: els sensors d' O_2 i els pseudo-sensors d' O_2 (Richalet, 1997).

1.2.1 Sensors d' O_2

Els sensors d' O_2 són quimiorceptors que detecten de manera indirecta la disminució d' O_2 . La detecció es realitza mitjançant dos successos possibles: per l'augment de la pressió parcial de CO_2 (pCO_2) i/o per l'increment de la concentració de protons (disminució de pH). Estan involucrats en sistemes de regulació amb retroalimentació que ajuden a restablir la disponibilitat d' O_2 a les cèl·lules.

Aquests circuits de feed-back es donen sobretot a nivell de ventilació, circulació i transport d' O_2 . A grans trets serien:

- a) Ventilació: s'aconsegueix una hiperventilació per disminuir la pressió arterial de CO_2 ($PaCO_2$) i augmentar d'aquesta manera la pressió arterial d' O_2 (PaO_2).
- b) Circulació: s'estimula l'activitat adrenèrgica per tal d'incrementar la freqüència i despesa cardíaca.
- c) Transport d' O_2 : s'activa la secreció d'eritropoetina (EPO) fet que comporta un increment de la disponibilitat d'eritròcits, d'hemoglobina i, per tant, d' O_2 als teixits. Explicat més detalladament en l'apartat 1.3.3 "*Eritropoetina (EPO)*" pàg. 17.

Les diferents estratègies conjuntes aporten una sèrie de variacions per tal de fer front a la hipòxia:

- L'estimulació dels quimiorceptors i la seva acció sobre la ventilació contribueixen a mantenir una pressió arterial d'O₂ òptima.
- L'eritropoesi contribueix a mantenir el contingut d'O₂ arterial.
- L'augment de l'activitat adrenèrgica restableix el transport arterial d'O₂.
- La formació de nous vasos sanguinis (angiogènesi) manté la pressió d'O₂ en els teixits.

Dins dels sensors d'O₂ tenim: *quimiorceptors centrals* i *quimiorceptors perifèrics*.

1.2.1.1 Quimiorceptors centrals

Aquests sensors són sensibles a les variacions de la concentració de protons (H⁺) en el cervell, que són deguts primàriament pels canvis en la PaCO₂. La barrera hematoencefàlica és permeable i dissol el diòxid de carboni, però és menys permeable al pas d'ions i encara menys al bicarbonat (HCO₃⁻). Per això, un augment de la PaCO₂ es reflexa ràpidament en el líquid cefaloraquídi, LCR

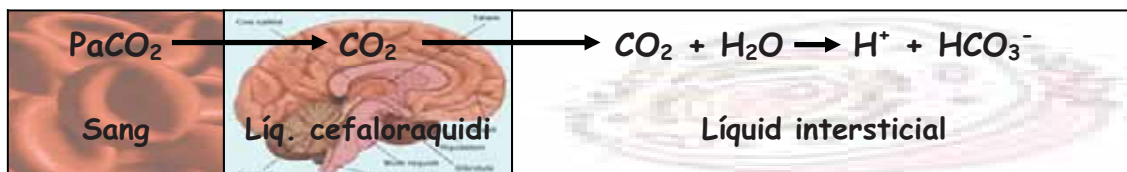
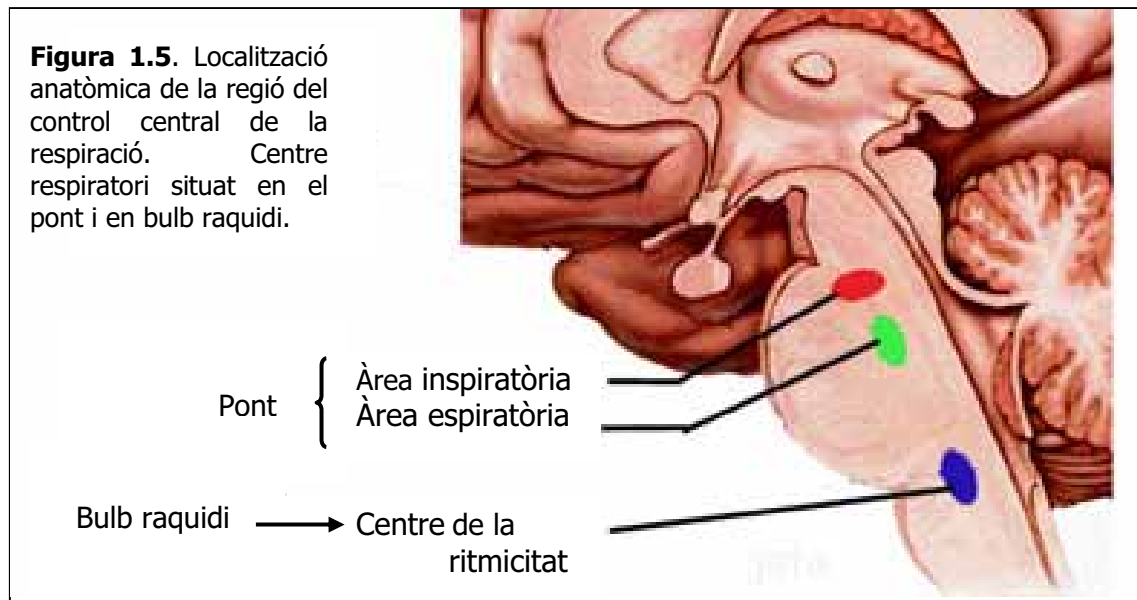


Figura 1.4. Equilibri del CO₂, HCO₃⁻ i els H⁺ entre els diferents compartiments.

(Fig. 1.4). Aquest CO₂ en el líquid intersticial o en l'interior dels teixits, reacciona amb l'H₂O formant àcid carbònic (H₂CO₃), que es dissocia en hidrogenions i bicarbonat, per la qual cosa incrementa la concentració d'ions hidrogen (disminució del pH). Aquest increment d'ions és detectat pels quimiorceptors centrals produint un augment de la freqüència respiratòria i de la ventilació per estimulació del centre respiratori, que eliminarà l'excés de CO₂ provocant la disminució de la concentració d'ions i l'augment dels nivells de pH. Aquests receptors centrals estan situats en el centre respiratori (tant inspiratori com espiratori) que es troba sota el quart ventricle, en el bulb raquídi (Fig. 1.5).

La pressió elevada de CO_2 afecta per igual si es troba en el LCR o en el líquid intersticial del bulb. Tot i així, l'efecte més ràpid es dona en el LCR, ja que, a diferència del líquid intersticial, aquest té una baixa presència d'esmoreïdors àcid-base.



La importància de la concentració de bicarbonat en el LCR per a la regulació de la ventilació s'entén a partir de l'equació de **Henderson-Hasselbalch**. Aquesta equació relaciona la PaCO_2 , el bicarbonat i el pH:

$$pH = pK_a + \log\left(\frac{[base]}{[àcid]}\right)$$

Segons aquesta equació, per a mantenir constant la concentració de protons, s'ha de produir un canvi en la concentració de bicarbonat que a la seva vegada provoca un canvi en la PaCO_2 (Fig. 1.6). Per això, una reducció de la concentració de bicarbonat provocarà un increment en la concentració d'ions hidrogen (disminució de pH) i aquest augment una estimulació dels quimiorceptors centrals que estimularan la ventilació. En conseqüència, es disminuirà la PaCO_2 , degut a l'augment de la freqüència respiratòria, i es restaurarà la concentració de protons. Per això, la reducció de la concentració de bicarbonat en el LCR té l'efecte d'activar els quimiorceptors per tal de respondre a més baixes PaCO_2 .

D'aquí la gran importància de la concentració de bicarbonat en el LCR per a la regulació de la ventilació (Fig. 1.7)

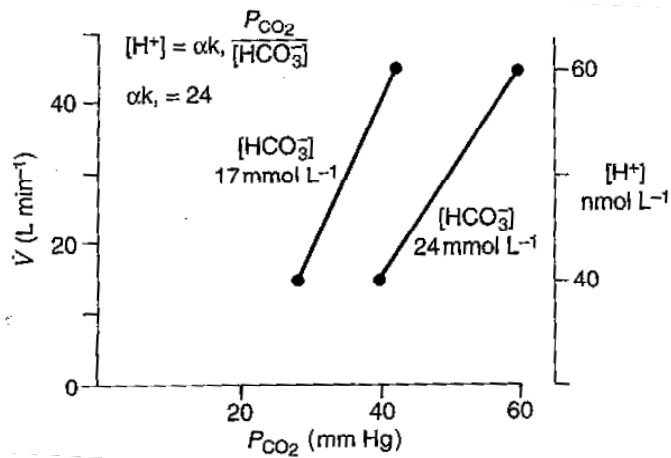


Figura 1.6. Efecte calculat de reduir la [HCO₃⁻] en el LCR en la resposta a hipercàpnia adaptativa (HCVR) usant l'equació de Henderson-Hasselbalch i assumint que el pH del LCR es manté constant per canvis induïts per la ventilació en la PaCO₂.
V, ventilació.

Figura extreta de "High altitude medicine and physiology". 3rd edition, Ward, Milledge & West. Ed. Arnold, 2000

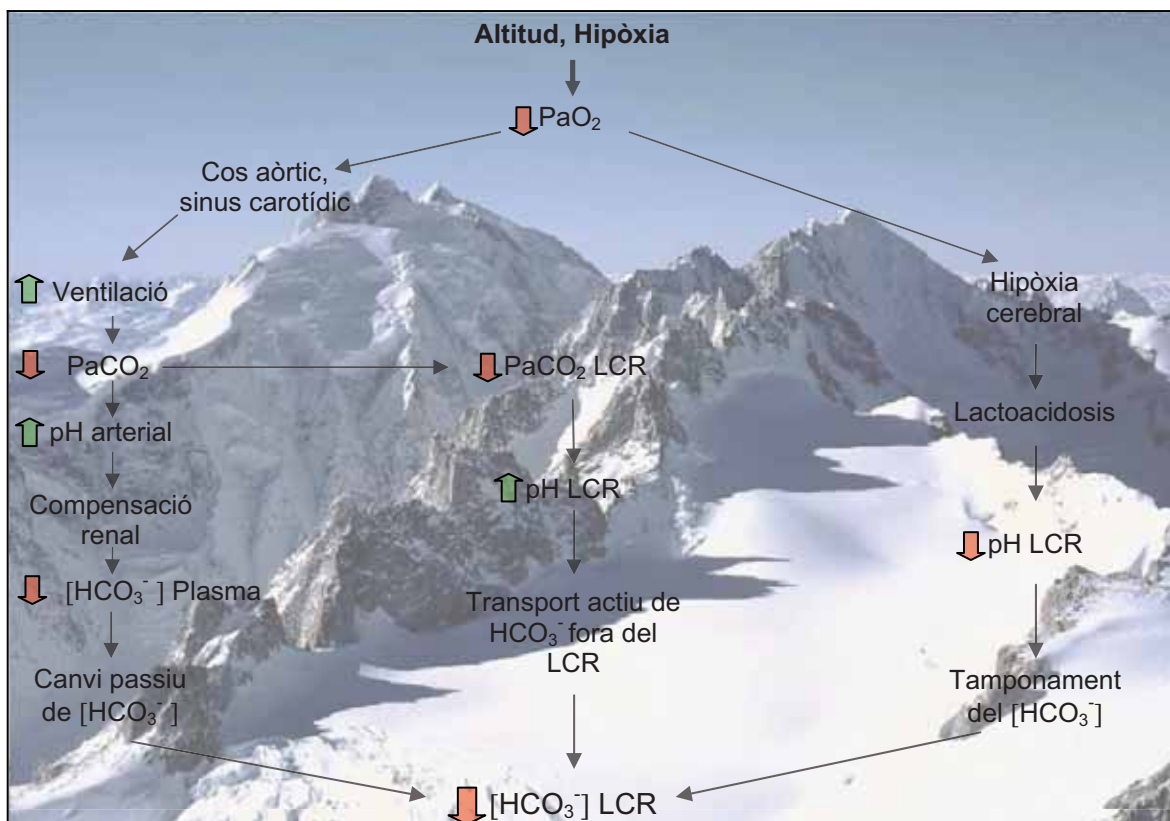


Figura 1.7. Possibles mecanismes pels quals la hipòxia podria causar la reducció de [HCO₃⁻] en el LCR.

1.2.1.2 Quimiorceptors perifèrics

Aquests quimiorceptors són terminacions nervioses en contacte amb els vasos sanguinis. Els principals sensors d'O₂ perifèrics són els sinus carotídic i els cossos aòrtics, situats a les artèries caròtida i aorta, respectivament (Fig. 1.8). Són molt sensibles als canvis de pO₂ arterial i per tant, detecten qualsevol petita variació d'aquest gas (Prabhakar, 2006). La informació és enviada per vies aferents cap al centre respiratori (Fig. 1.5), des d'on surten vies eferents cap als músculs respiratoris. La hiperventilació és la primera resposta aguda a l'altitud i es dona en qüestió de segons.

D'altres sensors perifèrics els trobem principalment al ronyó, però també en d'altres òrgans com en el fetge. Aquests detecten la disminució de la pressió arterial d'O₂ i provoquen la secreció d'EPO.

Hi ha però, molts altres factors que influeixen en aquesta secreció: demanda d'O₂, quantitat de ferro, factors nutricionals, afinitat de l'hemoglobina, etc.

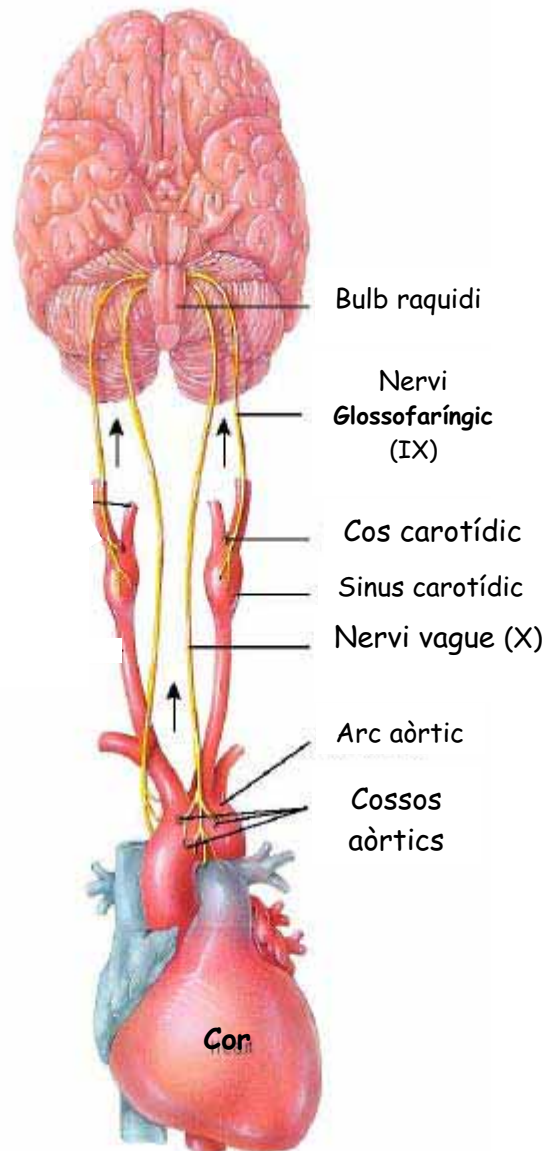


Figura 1.8. Situació anatómica dels quimiorceptors perifèrics: cos carotídic i sinus aòrtic.

1.2.2 Pseudo-sensors d'O₂

Els pseudo-sensors d'O₂ són cèl·lules activades per la falta d'O₂ però que no estan clarament involucrats en processos de regulació. Les cèl·lules endotelials alliberen un seguit de mediadors, com l'òxid nítric (NO), que provoquen canvis en la vasomotricitat, en l'hemostàsia, en la proliferació cel·lular i en la permeabilitat capil·lar. D'aquesta manera trobem, per exemple, cèl·lules musculars llises que es relaxen en els vasos d'òrgans perifèrics (per tal que arribi més volum sanguini) o es contrauen en els vasos pulmonars (per tal d'augmentar el temps de càrrega d'oxigen a la sang en els alvèols).

A més dels circuits neurals descrits també tenim diferents reflexos que es donen en la regulació nerviosa:

a) Reflex de Bainbridge: hi ha un augment de l'activitat cardíaca que es produeix degut a un augment momentani del retorn venós.

b) Reflex pressor: quan es produeix un augment de la pressió arterial es detecta pels cossos aòrtics i sinus carotítics enviant aferentment la informació a través dels nervis IX (glossofaríngic) i X (vague) fins al bulb raquidi. Després per les vies eferents del vago arribarà al cor on provocarà una disminució de la freqüència cardíaca i una davallada posterior de la pressió arterial.

c) Reflex de Hering-Breuer: evita que una excessiva expansió del pulmó pugui estripar o danyar el teixit pulmonar i contribueix a autoregular la respiració per canvis de volum pulmonar. En els pulmons hi ha una sèrie de terminacions nervioses (mecanoreceptors) que s'estimulen quan els pulmons s'expandeixen. Els impulsos originats en les terminacions van pel nervi vago fins al bulb raquidi, inhibint el centre inspiratori i excitant l'expiratori.

La secreció d'hormones per l'escorça adrenal, pulmó i cor també és modificada per la hipòxia, augmentant de manera considerable la secreció de catecolamines, corticosteroides, l'hormona antidiurètica (ADH), hormones

tiroidees i el glucagó. Per altra banda, es disminueix la secreció de renina i aldosterona.

Tot i així, no s'han trobat encara en les cèl·lules dels mamífers sensors capaços de detectar una reducció moderada d'O₂. Aquesta línia d'investigació representa una àrea de recerca interessant degut a l'important rol en el desenvolupament que aquests sensors d'O₂ tenen en la supervivència cel·lular i en la biologia tumoral (Schumacker, 2002).

En la figura 1.9 hi ha un esquema-resum sobre el control de la regulació química del sistema cardio-respiratori.

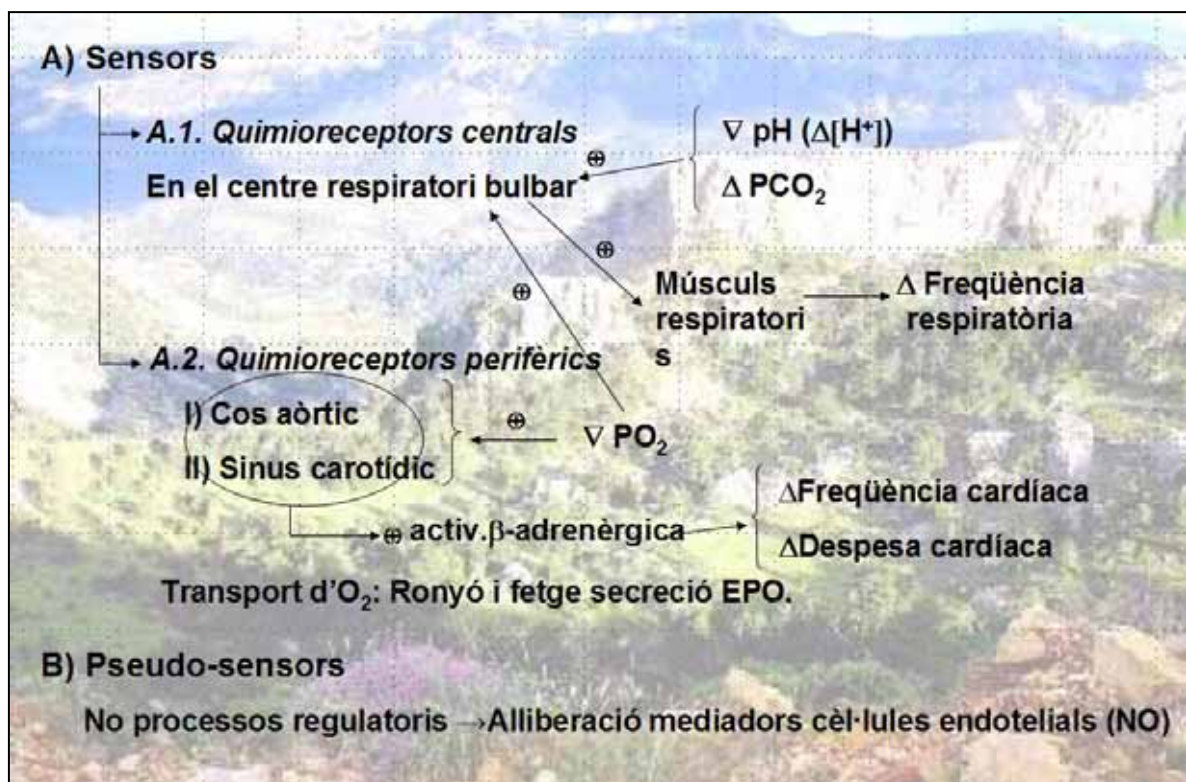


Figura 1.9. Esquema-resum del control químic del sistema cardio-respiratori.

1.3 Molècules induïbles per la hipòxia

1.3.1 HIF-1

Malgrat que s'han realitzat nombrosos estudis per conèixer la cascada de senyalització intramolecular en resposta a la deficiència d'O₂ hi ha molts punts que ens són desconeguts. Una de les molècules més conegudes és el factor de transcripció HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor). Aquesta proteïna funciona com a reguladora clau en condicions de baixa disponibilitat d'O₂, regulant l'expressió d'una sèrie de gens relacionats amb l'homeòstasi d'aquest gas (Semenza, 2002).

L'HIF-1 s'uneix a unes determinades seqüències de més de 70 gens de manera directa i a més de 200 de manera indirecta per tal d'estimular la producció de les proteïnes codificades per aquests (Wenger, 2006). Aquestes proteïnes estan involucrades en diferents processos com podrien ser: angiogènesis, eritropoiesis, transport de glucosa i de ferro, glicòlisis, proliferació i viabilitat cel·lular, remodelació vascular, respostes vasomotores, etc. (Fig. 1.10).

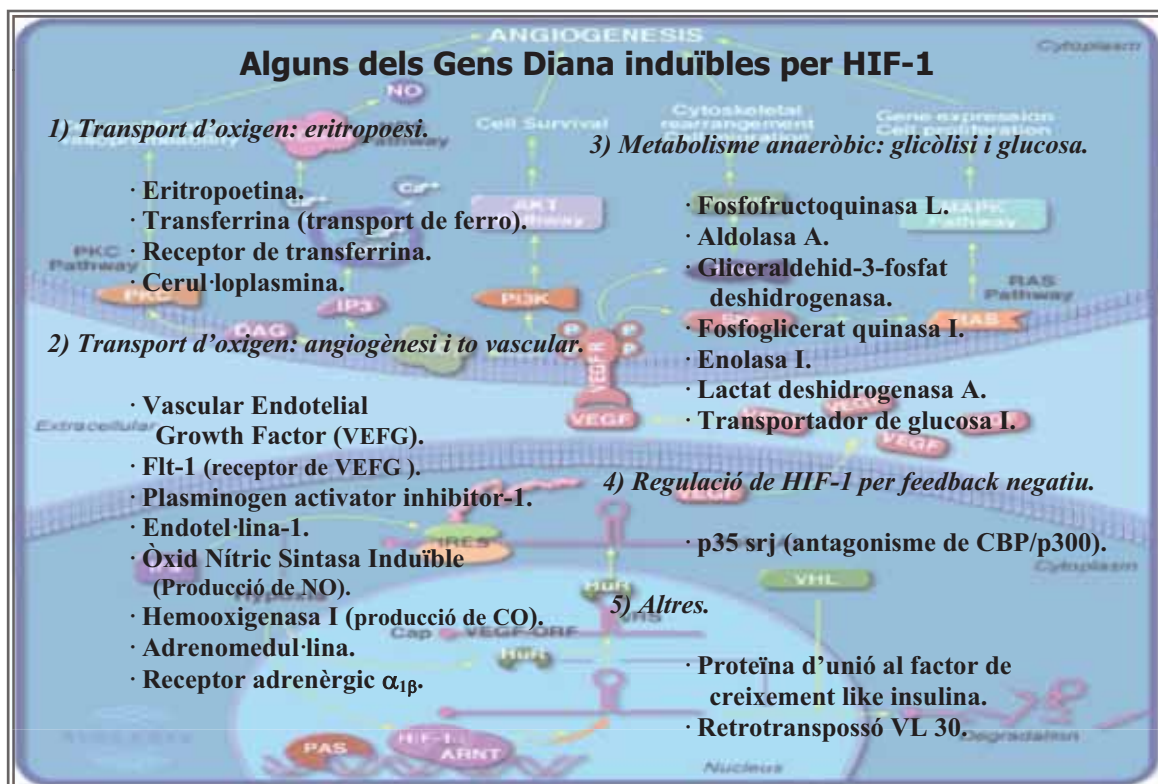


Figura 1.10. Alguns dels principals gens diana induïbles per HIF-1. Basat en Wenger, 2000.

D'altra banda, es creu que aquest factor de transcripció juga un paper clau en el desenvolupament de determinades malalties, com podrien ser: càncer, malalties cardiovasculars i del pulmó cròniques. Aquestes representen una de les majors causes de mortalitat actual en la societat industrialitzada. Conèixer els mecanismes d'acció i la regulació de HIF-1 ens podria ajudar a crear teràpies per tal de combatre les malalties abans esmentades (Folkman, 1995a; Semenza, 2000a).

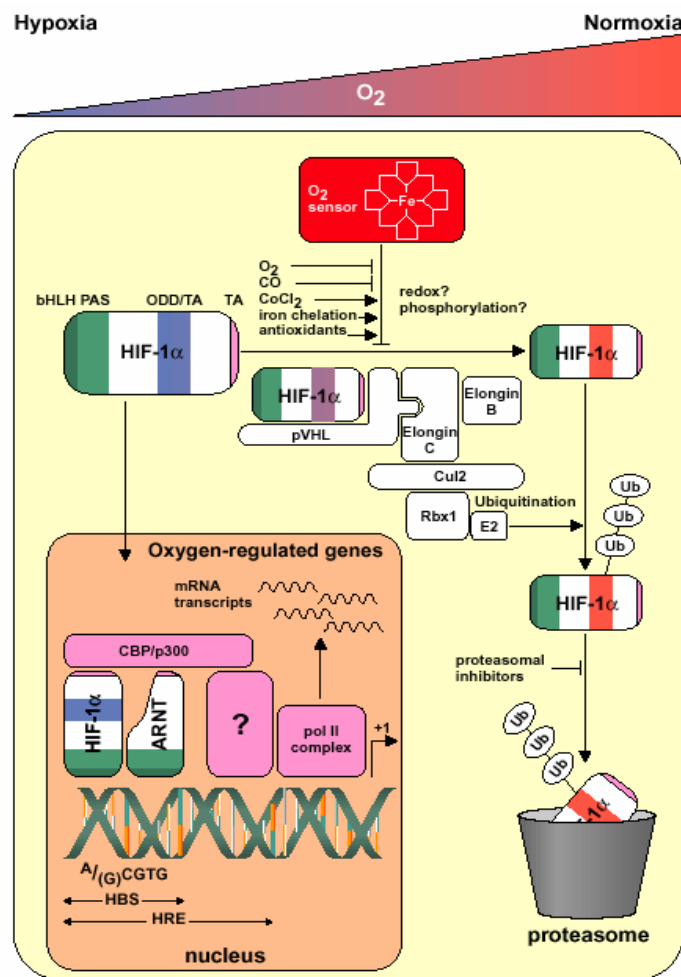


Figura 1.11. Esquema del mecanisme d'acció de HIF-1.
Figura obtinguda de Wenger, 2000.

1.3.1.1 Estructura, mecanisme i senyal de transducció de HIF-1 (Fig. 1.11)

HIF-1 és un factor de transcripció proteic heterodimèric expressat constitutivament i format per una subunitat α i una altra β .

La subunitat α en condicions de normòxia és ràpidament ubiquïnitzada i degradada pel proteosoma. Aquest procés està regulat per diferents factors com fosfoinositol-3-fosfat (PI3K) o map kinases (MAPK), entre d'altres, que hidroxilen diferents residus de prolina de la subunitat α , senyal de reconeixement per a la degradació per part del proteosoma. Aquest domini hidroxil·lable s'anomena ODDD (Oxygen Dependent Degradation Domain) (Semenza, 2000b; Wenger, 2000).

En presència de determinades molècules, com quelants de ferro, o sota la pressió de determinades condicions ambientals, com la hipòxia, s'evita la ubiquïnització de la HIF-1 α , i per tant la seva degradació. És a dir, els nivells de HIF-1 α augmenten de manera inversament proporcional a la concentració d'O₂. A menys disponibilitat d'O₂ més concentració de HIF-1 α trobarem.

D'altra banda, la subunitat β , també coneguda com ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Transporter) es troba de manera constitutiva en el citosol de les cèl·lules, independentment de la concentració d'O₂. La unió de les dues subunitats és condició indispensable per a que HIF-1 s'uneixi a les seqüències específiques, HRE (Hypoxia Element Response), de DNA dels gens diana (Fig. 1.11).

1.3.2. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

Un dels gens diana claus en els processos d'hipòxia és el gen del VEGF. Aquest factor, com el seu nom indica, provoca la formació de nous vasos sanguinis i capil·lars (procés conegut amb el nom d'angiogènesi) augmentant la descàrrega d'O₂ en els teixits (Carmeliet, 2005a,b). En els processos cancerígens succeeix el mateix fenomen. Per a que hi hagi el creixement de la massa tumoral és necessària l'aparició de nous vasos sanguinis. Per aquest motiu, es pensa en la inhibició en primera instància del VEGF per provocar en definitiva l'aturada de

l'angiogènesi com a possible teràpia anticancerígena (Ferrara, 2005). De fet, hi ha estudis que demostren que la combinació de quimioteràpia i inhibidors de l'angiogènesi millora el tractament tumoral augmentant la supervivència dels malalts (Ferrara & Kerbel, 2005). Tot i així encara falta molt per estudiar en aquest camp: dosis, inici, durada, monitoratge del tractament, entre d'altres factors.

D'altra banda, i en sentit oposat, es podria estimular l'angiogènesi per tal de solucionar, totalment o parcialment, possibles isquèmies, infarts o altres patologies que desencadenin o provoquin una mala perfusió, i aconseguir que tornin a estar irrigades zones o regions amb necrosi, quan en determinades situacions no hi ha possibilitat de procediments de reconstrucció quirúrgics (Shima et al., 1995; Tateishi-Yuyama et al., 2002).

1.3.3. EPO (Eritropoetina)

Un altre dels gens estimulats per l'HIF-1 és el de l'eritropoetina (EPO). Aquesta hormona glucoproteica renal estimula la síntesi en la medulla òssia de nous reticulòcits, precursors dels eritròcits (Fig. 1.12) i per tant, en últim terme, incrementa l'aportació d'O₂ a nivell sistèmic. La pèrdua de sang també provoca la secreció de l'EPO. Tot i així, aquesta no és la única funció de l'EPO, ja que també s'han trobat receptors eritropoètics en teixits no hematopoètics, com per exemple en el sistema nerviós central (SNC), on tindria un efecte neurotròfic i neuroprotector prevenint la mort de les neurones en front l'estímul hipòxic o del glutamat (Siren & Ehrenreich, 2001). D'igual manera existeixen receptors d'EPO en els cardiomiòcits on també podria desenvolupar un paper protector en el miocardi. Respecte a l'acció de l'EPO en els vasos sanguinis, estimula l'angiogènesi i la producció d'endotel·lina i altres mediadors vasoactius.

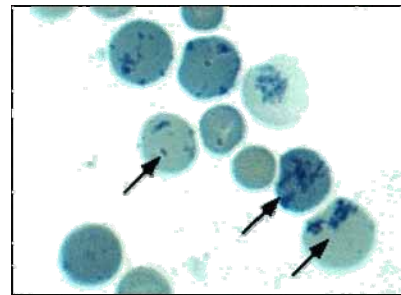


Figura 1.12. Foto feta a 40 augments d'un frotis de sang de rata on es poden apreciar els reticulòcits.

Per altra banda, s'ha de tenir en compte que l'eritropoetina presenta un cicle circadiari, amb valors màxims entre les 4 de la tarda i les 10 de la nit, junt amb uns valors mínims a primeres hores del matí.

1.4 Mecanismes Compensatoris

En primer lloc seria convenient establir les diferències entre el que definim com aclimatació i adaptació (Banchero, 1987).

- En l'adaptació els canvis que es produeixen són estables i definitius. Els mecanismes que es donen són transmissibles de generació en generació i no reversibles. Es donen a llarg termini, després d'aclimatacions permanents junt amb l'efecte de la selecció natural per tal de desenvolupar-se millor en l'altitud.

Aclimatació crònica + selecció natural = Adaptació

Aquests canvis els podem apreciar, per exemple, en els pastors tibetans: no presenten hipertensió arterial pulmonar, però sí hipoglobúria, hipometabolisme i menys treball cardíac.

- En l'aclimatació els canvis que es produeixen són temporals i transitoris. Els mecanismes que es donen són reversibles i no transmissibles de generació en generació.

Són canvis a curt termini que poden tardar a produir-se des de segons (hiperventilació, increment de la despesa cardíaca, vasodilatació arterial sistèmica) fins a dies (activació del metabolisme i transport glucosa, eritropoesi, angiogènesi i neovascularització). Es donen per tal d'apaivagar els efectes de la baixada de la pressió parcial d'oxigen.

Existeixen diferents mecanismes d'aclimatació a l'altura depenent del grau d'hipòxia i de la durada (Hochachka, 1998). Alguns dels quals tenen un comportament bifàsic. Els principals mecanismes són (Fig. 1.13):

1. Respiratoris.
2. Cardiovasculars.
3. Hematològics.
4. Cel·lulars i metabòlics.

1.4.1 Mecanismes respiratoris

En front a la hipòxia es dona una hiperventilació inicial (West, 1993) per disminuir la pressió parcial arterial de CO_2 i augmentar d'aquesta manera la d' O_2 (com ja hem vist a l'apartat 1.2 "*Mecanismes de regulació deguts a la hipòxia*" pàg. 7). Aquest procés és difícil de mantenir molt de temps, degut a que es produeix una alcalosi respiratòria, fet que augmenta l'afinitat de l'hemoglobina per l' O_2 , amb el conseqüent problema a l'hora d'alliberar-lo després en els teixits (Cerretelli & Samaja, 2003).

També es produeix, entre d'altres, per exemple, una vasodilatació perifèrica, per tal d'augmentar el volum sanguini que arriba als teixits, una vasoconstricció alveolar, per tal d'augmentar el temps en que la sang s'oxigena en els pulmons. A curt termini augmenta l'aportació d' O_2 , però a mig termini pot provocar problemes com hipertensió i edemes pulmonars.

1.4.2 Mecanismes cardiovasculars

A curt termini, en pocs minuts, hi ha una estimulació de l'activitat simpàtica que comporta un augment de la freqüència cardíaca. Aquesta taquicàrdia és difícil de mantenir degut a la important despesa cardíaca que es produeix (Peacock, 1998). En estadis més llargs, després de setmanes, es produeix una disminució de la freqüència cardíaca al disminuir el volum sistòlic. Es pot utilitzar aquesta freqüència en repòs com a indicador d'aclimatació (Mashkovskii, 1975; Richalet, et al., 1989).

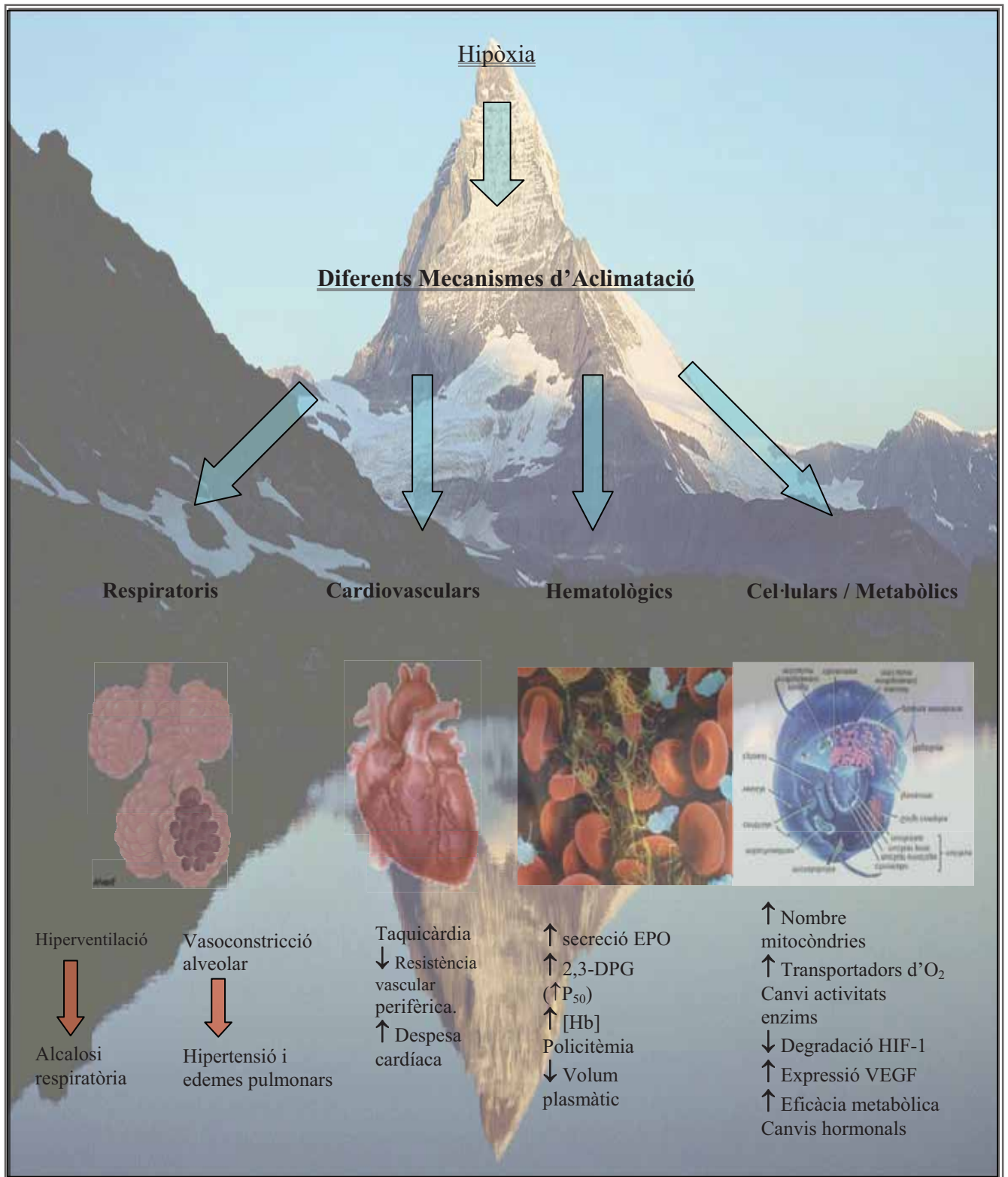


Figura 1.13. Esquema-resum de les principals respostes d'acclimatació a l'altura.

A més llarg termini hi ha un augment del nombre i obertura dels capil·lars sanguinis, disminució de la distància de difusió de l'O₂ en les fibres i disminució

de les resistències vasculars musculars o perifèriques, com a exemples més importants (León-Velarde et al., 1993).

1.4.3 Mecanismes hematològics

Degut a l'estimulació de la secreció d'eritropoetina (EPO) i hemoglobina (Eckardt & Bauer, 1989; Ferretti et al., 1990), tenim una major disponibilitat d'eritròcits, que fan augmentar el transport d'O₂ a mig termini. Malgrat l'augment de cèl·lules sanguínies no es produeix un increment en la viscositat, fet que dificultaria la circulació sanguínia i el transport d'O₂ (Rodríguez et al., 1999; Viscor et al., 2000).

També es produeix un canvi d'afinitat Hb-O₂ (Cerretelli & Samaja, 2003), augmentant l'efecte Bohr, degut a la major diferència de pH entre la sang venosa i arterial, afavorint un transport d'O₂ més adequat per a les noves condicions (Fig. 1.14).

L'augment de 2,3-difosfoglicerat es produeix quasi bé immediatament després de l'arribada a l'altitud (2,3-DPG és un potent efector al·lostèric de les propietats d'unió de l'O₂ a l'hemoglobina). Aquest fet comporta el desplaçament de la corba de dissociació de l'hemoglobina cap a la dreta (Fig. 1.13), augmentant la P₅₀, produint-se una disminució de l'afinitat de l'hemoglobina per l'O₂ i afavorint, per tant, l'alliberació d'aquest en els teixits.

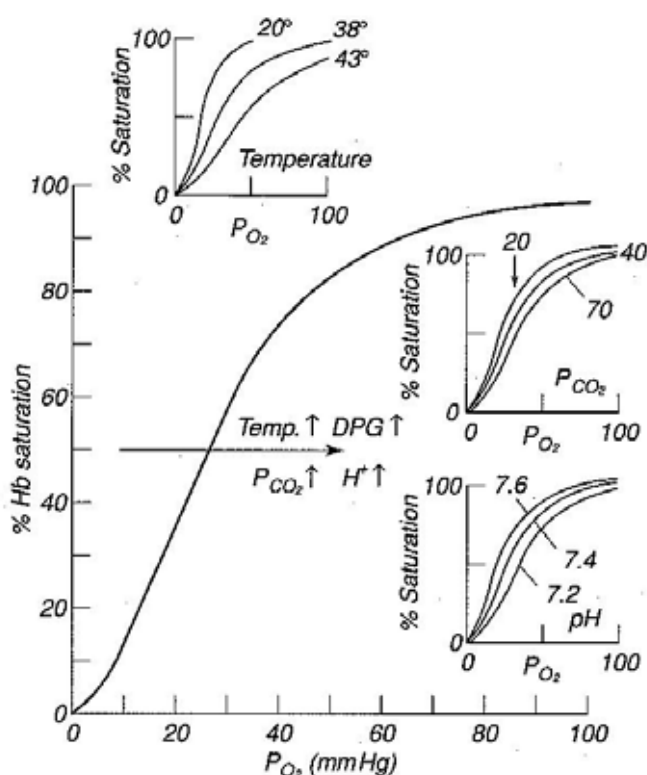


Figura 1.14. Corba de dissociació d'oxigen en condició normal i els seus desplaçaments per increment de H⁺, temperatura i 2,3-difosfoglicerat (DPG). 3rd edition, Ward, Milledge & West. Ed. Arnold, 2000.

1.4.4. Mecanismes cel·lulars i metabòlics

Hi ha a la vegada una sèrie de modificacions a nivell cel·lular:

En la *membrana cel·lular* s'activen transportadors actius d'O₂ provocant variacions en la permeabilitat d'aquest gas. També hi ha una augment del nombre de mitocondries per tal de millorar l'oxidació a llarg termini.

Es produeix un canvi en el *metabolisme energètic*, comportant que el quocient respiratori (RQ) s'aproximi a 1 (fet que succeeix si només es metabolitzen carbohidrats, vers 0,7 en cas de fer-ho només amb lípids). El resultat d'aquest canvi afecta la composició dels gasos alveolars i per a qualsevol canvi de PaCO₂ la PaO₂ s'incrementa, respecte a la condició de RQ=0,7, i per tant, també augmenta la captació d'oxigen en la superfície respiratòria i la difusió d'O₂ cap a la sang (Fig. 1.15).

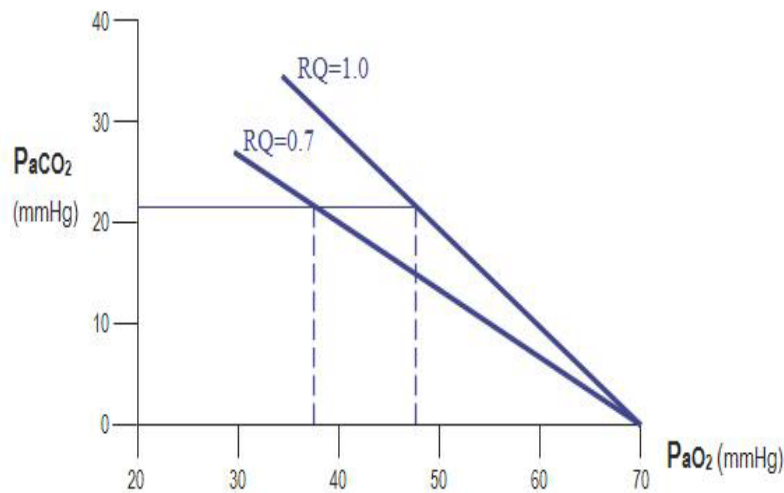


Figura 1.15. Diagrama PaCO₂-PaO₂ mostrant l'efecte del quocient respiratori (RQ) en la PaO₂ alveolar donada una PaCO₂. Canvis de RQ de 0,7 (quan s'utilitzen lípids) a 1,0 (RQ quan es metabolitzen carbohidrats) fan incrementar la PaO₂ de 37,2 a 47,0 mmHg, afavorint d'aquesta manera la difusió d'aquesta molècula cap a la sang. Figura extreta de "High altitude medicine and physiology". 3rd edition, Ward, Milledge & West. Ed. Arnold, 2000.

Es produeixen tanmateix una sèrie de canvis en les *activitats enzimàtiques* i en l'expressió de determinades *molècules intermediàries* o de la cascada de senyalització, com per exemple HIF-1 i VEGF (Wenger, 2000).

Tots aquests mecanismes no es posen en marxa en el mateix instant (Taula 1.1 i Fig. 1.16). N'hi ha de pràcticament immediats controlats pel sistema nerviós central, com la hiperventilació, i d'altres depenents del control endocrí (biosíntesi, alliberació, senyalització a nivell de membrana nuclear i posada en marxa d'accions eferents) com podria ser la síntesi d'EPO, que tarden més

temps en ser efectius. En principi, com més ràpid s'activa un mecanisme compensatori més ineficaç és. I a la inversa.

RESPOSTA	ORGAN O TEIXIT	CINÈTICA
Increment despesa cardíaca	quimiorceptors perifèrics, múscul cardíac	Ràpides, agudes (de segons a minuts)
Hiperventilació	arterial i quimiorceptors vies aèries	
Vasodilatació arterial sistèmica	endoteli arterial i múscul llis	
Vasoconstricció pulmonar	endoteli vascular, resistència miòcits vasos pulmonars	
Activació del consum de glucosa	múscul cardíac i esquelètic, teixits grassos	
Activació del metabolisme i transport glucosa	a molts teixits	Lentes, cròniques (d'hores a dies)
Eritropoesi	medul·la òssia	
Angiogènesi i neovascularització	endoteli vascular, teixits hipòxics o isquèemics	
Hipertròfia teixits i remodelat	paret pulmonar arterial, miocardi, cos carotídic	
Producció de vasodilatadors	endoteli vascular i musculatura llisa	

Taula 1.1. Quadre exemple de les respostes a la hipòxia i el temps emprat en donar-se.

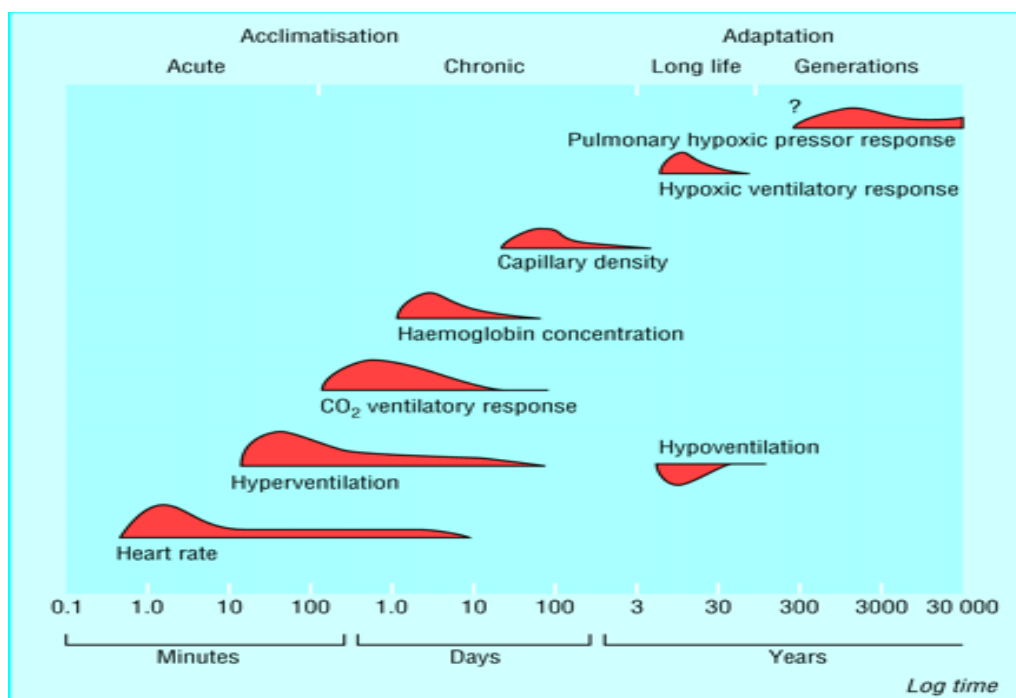


Figura 1.16. De l'acclimatació a l'adaptació. Temps necessaris per a que es produeixin canvis acclimatatius i adaptatius esquematitzats en una escala de temps logarítmica. La corba de cada resposta denota la taxa del canvi. Extret de Peacock, 1998.

1.5 Patologies

Relacionades amb els mecanismes compensatoris hi ha tota una sèrie de patologies associades a la mala tolerància a l'altura. La seva clínica s'explica a continuació breument:

1.5.1 Mal agut de muntanya (Acute Mountain Sickness, AMS)

El mecanisme principal del AMS és un edema cerebral lleu que desencadena tots els símptomes (mal de cap, anorèxia, nàusees, vòmit, insomni, disminució de la diuresi normal, dificultat per dormir i cansament). L'edema és degut a la descompensació entre els mecanismes vasogènics del flux sanguini cerebral i la permeabilitat dels vasos, creant-se alteracions en la homeòstasi dels fluids i electròlits i retenint-se inadequadament l'aigua. No existeix una exploració característica. El tractament bàsic és el descens o parar i esperar abans de continuar. Seguir pujant amb presència de símptomes és poc recomanable. El mal de cap es pot tractar amb paracetamol o aspirina, si no es millora és obligatori el descens (Hackett, 2003).



1.5.2 Edema pulmonar d'altura (High Altitude Pulmonary Edema, HAPE)

El HAPE es presenta com una forma potencialment letal del AMS. Hi ha diferents hipòtesis, però el mecanisme més acceptat és la vasoconstricció deguda a la hipòxia. La hipertensió en els capil·lars pulmonars fa que hi hagi una alteració en el transport proteic i de líquids provocant un envasament del líquid intersticial, en primera instància, i després en els alvèols que dificulta l'intercanvi gasos (Fig. 1.17). També hi ha evidències d'inflamació. El HAPE lleu es presenta amb descens del rendiment físic, cansament, disnees d'esforç (no en repòs), tos seca i estretors localitzats. En HAPE moderats a severos hi ha una marcada debilitat i cansament, cianosi, tos seca i irritant, taquipnea,

taquicàrdia, estretors, sensació de bulliment toràcic i després tos productiva, en ocasions hemoptoica, a més, el fred i l'exercici augmenten la tensió arterial pulmonar. La clínica neurològica també pot estar present. Junt amb el descens es pot donar Nifedipina. Una cambra hiperbàrica portàtil és molt útil per a revertir els efectes de l'altitud. L'oxigen, si se'n disposa, millora l'oxigenació arterial i disminueix la hipertensió arterial i pulmonar (Bärtsch et al., 2003; Fischer, 2003).

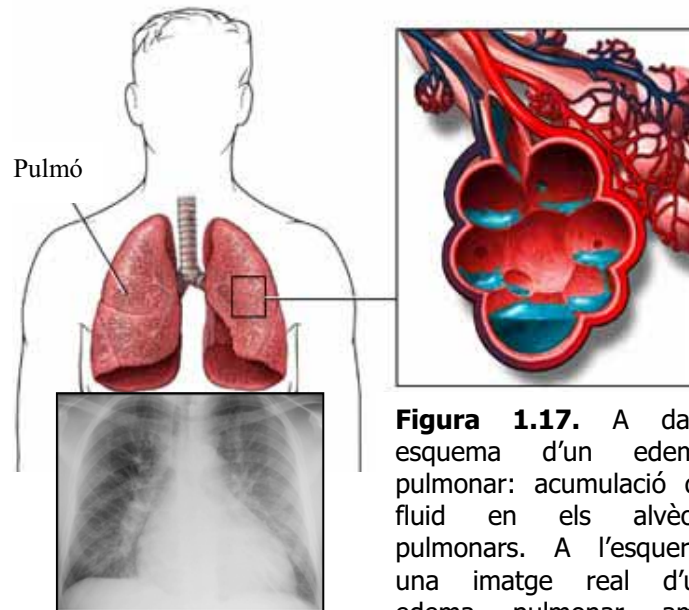


Figura 1.17. A dalt, esquema d'un edema pulmonar: acumulació de fluid en els alvèols pulmonars. A l'esquerra una imatge real d'un edema pulmonar amb raigs X.

1.5.3 Edema cerebral d'altura (High Altitude Cerebral Edema, HACE)

El mecanisme de desenvolupament del HACE no és del tot conegut. Probablement és el mateix que a l'inici del AMS, però sense control ni tractament (Fig. 1.18). Seria causat per un increment de la permeabilitat microvascular que provocaria un moviment dels fluids i de les proteïnes fora del compartiment vascular. Aquest edema podria ser induït per l'òxid nítric sintasa induïble (iNOS), que faria augmentar els nivells d'NO, facilitant l'increment de la permeabilitat vascular. La valoració està basada en el deteriorament neurològic progressiu amb canvis de consciència, atàxia, pèrdua progressiva del judici, al·lucinacions, mal de cap sever i eventualment coma. El tractament bàsic és el descens i l'oxigen. Sovint s'observa HAPE concomitant. El tractament farmacològic inclou la



Figura 1.18. Edema cerebral d'altura captat per tomografia axial computeritzada (TAC).

dexametasona. La resposta es dona en 12-24 hores, però el descens és obligat. Es pot utilitzar la cambra hiperbàrica portàtil si se'n disposa (Baumgartner, 2003; Hackett, 2003).

1.5.4 Edema perifèric

L'altitud pot causar edema de mans, cames o cara (normalment edema periorbitari). L'edema es resol amb el descens, però no és obligatori si no s'acompanya d'altres situacions.

1.5.5 Cardiopatia subaguda de muntanya

El mal subagut de muntanya és un trastorn inusual que s'ha descrit en nens de pares xinesos en altituds moderades o traslladats allí posteriorment, així com també en soldats destinats a altituds de més de 6.000 metres durant setmanes o mesos.

Aquesta alteració es produeix degut a una insuficiència cardíaca que dona lloc a una gran acumulació de líquid en els pulmons, l'abdomen i les cames. El descens a una altitud menor cura la malaltia i és imprescindible per a salvar la vida de la víctima.

1.5.6 Mal crònic de muntanya (eritrocitosi excessiva o malaltia de Monge)

Descrita pel peruà Carlos Monge al 1925 com a "Síndrome eritrèmic de les altures", el mal de muntanya crònic es desenvolupa gradualment al llarg de varis mesos o anys en individus que habiten a gran altura.

Es produeix quan el cos realitza una compensació excessiva per la falta d'oxigen, produint massa glòbuls vermells (policitèmia secundària). Els símptomes consisteixen en ofec, letargia i diversos dolors i molèsties. És possible que es formin coàguls de sang en les cames i en els pulmons (hipertensió pulmonar) i que el cor falli (cor pulmonale). La persona queda incapacitada i mor si no es trasllada a una altitud menor (Ge Ri-li, et al., 2003; Gibbs & Galliford, 2003).

1.5.7 Retinopatia

Les hemorràgies retinals apareixen quan el flux sanguini cerebral es veu augmentat. Els vasos es dilaten i l'increment sobtat de pressió en aquests provoca aquestes microruptures (Fig. 1.19). Són comuns per damunt dels 5.000 metres, però es poden trobar a menys altitud. Solen aparèixer als pocs dies d'estar en altitud, són generalment asimptomàtiques, no cal descendir a menys que comprometi l'agudesesa visual, de forma lleu o severa (afectació de la màcula). Normalment es resolen amb el descens, encara que poden persistir anys o la resta de la vida (Clarke & Duff, 1975).



Figura 1.19. Fotografia d'hemorràgies retinàries degudes a l'altura.

1.5.8 Deteriorament d'alta altitud

Aquest terme fou emprat per primer cop en les primeres expedicions a l'Everest per tal de notar el deteriorament de les condicions físiques i mentals com a resultat d'una estada perllongada en altitud. Els símptomes i signes del deteriorament poden ser causats per diferents factors, tal com deshidratació, fred, cansament físic extrem. L'altitud a la que s'inicia és una variable individual, però sol ser al voltant dels 5.500 metres. Aquests deteriorament es caracteritza per pèrdua de pes, disminució de la gana, fatiga i lenta recuperació, alteració del son, letargia, irritabilitat i alteracions dels processos mentals, hipotensió sistèmica. Els mecanismes específics d'aquestes alteracions no són del tot coneguts (Milledge, 2003).

1.6 Hipòxia Intermitent

A continuació descriurem més detalladament la hipòxia intermitent, ja que els nostres estudis es basen en aquest tipus d'hipòxia hipobàrica (HHI).

La majoria dels estudis sobre la hipòxia es centren en les exposicions cròniques (aclimatacions a llarg termini o, fins i tot, de gent nativa a mitjana i gran altura) i en les exposicions agudes (canvis ràpids i puntuals, degut a una curta estada en altitud). Molt menys coneguts són els canvis fisiològics atribuïts a una exposició intermitent.

Malgrat això, se sap que la hipòxia intermitent és un estimulador més potent que la hipòxia crònica i, depenent del protocol d'hipòxia (intermitent o crònica), es poden desenvolupar efectes diferents. Aquestes variacions es produeixen sobretot, degut als episodis de re-oxigenació o mecanismes d'isquèmia-reperfusió. Aquests mecanismes representen un estrès oxidatiu degut a la producció d'espècies d'O₂ reactives (ROS), sobretot de l'anió superòxid, O₂⁻ (Prabhakar et al., 2001; Askew, 2002).

Les exposicions intermitents ens poden aportar una sèrie d'avantatges respecte a les exposicions cròniques o agudes. Ens permetrien aconseguir les adaptacions pròpies de l'exposició crònica: respiratòries, cardiovasculars, metabòliques, etc., amb el benefici d'evitar els inconvenients d'una exposició perllongada: problemes neurals i vasculars, deficiències cognitives, atrofies musculars, pèrdues de gana i de pes, fatiga, alteració de la son, hipertensió, estrès oxidatiu mitocondrial, etc. (Bancho, 1987; Zhuang & Zhou, 1999; Neubauer, 2001).

A més, la hipòxia intermitent té un efecte acumulatiu que comença amb la primera exposició. El primer aspecte positiu és la possibilitat d'aclimatar-nos a grans altures sense haver de desplaçar-nos a una muntanya, ja que s'utilitzen cambres hipobàriques. El funcionament i base teòrica d'aquestes cambres l'explicarem detalladament en l'apartat 1.7 "*Cambres hipobàriques*" pàg. 32). El

fet de ser intermitent ens pot proporcionar també un estalvi en el temps invertit per a l'aclimatació i no és necessari variar considerablement el nostre ritme de vida. Addicionalment ens pot aportar protecció enfront malalties: efecte antiarítmic, cardioprotector (Milano et al., 2002), prevenció d'arteriosclerosi (estudiat en conills), així com una millora del rendiment físic (Rodríguez et al., 1999; Casas et al., 2000).

1.6.1 Hipòxia intermitent en la vida real

Hi ha moltes situacions de la vida quotidiana i algunes patologies en les que es produeix una hipòxia intermitent, encara que la majoria d'elles ens passen desapercebudes (Clanton & Klawitter, 2001; Prabhakar, 2001; Prabhakar et al., 2001; Sieck, 2004). Algunes d'elles són:

1.6.1.1 OSA (Obstructive Sleep Apnea)

Malaltia que afecta tant a adults com a nens. Es caracteritza per l'aturada respiratòria durant les fases de somni, sovint més de 60 cops/hora. Es produeix una disminució de la saturació de l'hemoglobina, fins a valors tan baixos com podrien ser el 50% (Neubauer, 2001). Els pacients amb aquesta alteració de la son tenen una gran predisposició a sofrir infarts de miocardi, hipertensions pulmonars i embòlies (Prabhakar, 2002). A més, es creu que pot tenir conseqüències adverses a nivell neurològic (Kalaria et al., 2004), així com també una sensació de cansament, astènia, somnolència (que sovint provoca accidents laborals i de trànsit) i mal humor durant el dia, degut a un descans inadequat. La incidència d'aquesta malaltia no és trivial, com mostren els següents valors a mode d'exemple. Només als EUA més de 18 milions d'habitants es veuen afectats per aquesta apnea. Això comporta el 24% dels homes, el 9% de les dones i el 2% dels nens, respecte a la població general dels EUA i és la major causa de morbiditat i mortalitat d'aquest país (Yuan et al., 2005). En l'Estat Espanyol estan diagnosticats uns percentatges similars, però també és cert que molts dels afectats desconeixen la seva patologia. Al 2006 va ser l'any internacional de l'OSA.

1.6.1.2 Síndrome de la hipoventilació congènita i apnees de premaduresa infantil

Les apnees provoquen pauses massa llargues (més de 15 segons) en la respiració dels nadons. Junt a aquestes aturades en la respiració, la freqüència cardíaca del nadó disminueix i es posa d'un color blavós. Afecta a quasi el 100% dels infants de menys de 30 setmanes de vida. Hi ha diferents raons per les que un nadó pot patir apnees: infeccions, convulsions o altres problemes cerebrals, bloqueig de les vies, immaduresa del sistema nerviós. La supervivència d'aquests nadons ha augmentat molt en les últimes dècades degut a la gran quantitat d'estudis realitzats en aquest camp (Moore et al., 2006).

1.6.1.3 Malalties cardiovasculars i respiratòries

Les malalties més freqüents dels nostres temps moderns indubtablement inclouen estats d'hipòxia en el sistema cardiovascular (Deindl et al., 2003). Els exemples més clars són: els infarts de miocardi, angines de pit, malalties pulmonars obstructives cròniques (EPOC), fibrosi cística, apoplexies o embòlies (Milano et al., 2002).

1.6.1.4 Treball en altitud

a) Situació dels miners a Sud-Amèrica (altiplà andí) i Àsia central. En aquests casos s'alternen de manera regular i periòdica cicles d'hipòxia amb *treball a les mines* (per sobre dels 3.500 m) i cicles de normòxia o descans a nivell del mar.

Alguns dels torns de treball són:

Xile i Argentina: 1 setmana hipòxia / 1 setmana en normòxia.

Perú i Bolívia: 3 setmanes hipòxia / 1 setmana en normòxia.

Àsia central: Tajikistan, Uzbekistan, Kirguisistan y Kazakstan: sense dades disponibles.

b) Instal·lacions astronòmiques: observatoris, telescopis i radiotelescopis.

Per exemple el radiotelescopi ALMA (Atacama Large Millimeter Assay), situat a 5.100 m en l'altiplà xilè de Chajnantor i que estarà en funcionament el 2012. D'altres a una altura menor, però considerable, podrien ser els telescopis de Mauna Kea a Hawaii sobre 4.204 m que forma part de l'organització no governamental CFHT (Canada-France-Hawaii Telescope), l'observatori de Roque de Los Muchachos, a l'illa de Gran Canaria a 2.300 m o l'observatori de Callar Alto Sierra Nevada a 2.160 m.

c) Instal·lacions militars: Tibet (Índia/Xina/Butan/Nepal), Caxmir (Índia/Pakistan) al voltant dels 4.000 metres d'altitud.

d) Obres civils: com la construcció del ferrocarril transtibetà (Lhasa Railway) de 1.142 km i a una altura mitjana de 4.500 m i que ha estat inaugurat recentment (agost 2006).

1.6.1.5 Exposicions puntuals a mitjana i gran altura

Amb o sense exercici. En l'actualitat, s'està produint un gran augment del nombre de persones que realitzen excursions per oci (muntanyisme, trekking, alpinisme, esquí, esquí extrem, etc.) o expedicions a mitjana i gran altura (Andes, Tibet, Himàlaia, Kenya, etc.).

1.6.1.6 Altres situacions

En els vols de llarga durada la cabina d'un avió està pressuritzada, típicament, entre 1.800 i 2.500 m, havent-hi més que una possible relació entre la pressió de l'avió i la TVP, Trombosi Venosa Profunda o síndrome de la classe turista, (Peacock, 1998). En l'exercici extenuant i amb deficiència d'O₂ per malalties cròniques: fallada cardíaca, pulmonar. En l'apnea de l'esportista, comparable amb les respostes de busseig dels animals marins. En l'anèmia falciforme agreujada en episodis d'hipòxia. En les estacions orbitals, on la pressurització, a l'igual que un avió civil, és inferior a la que correspondria a nivell del mar...

1.6.2 Perspectives de Futur

L'estudi de la hipòxia intermitent té un gran potencial en l'àrea de la salut, ja que la hipòxia afecta a tots els òrgans i sistemes, des del cardiovascular fins al neurològic.

Evidentment, no tot el relacionat amb la hipòxia intermitent ens aportarà beneficis. Per la qual cosa, hem d'estudiar quines respostes o aclimatacions degudes a una acumulació d'hipòxia ens poden ser beneficioses i quines perjudicials. També hem d'establir la durada i temps que tarden en donar-se les respostes per tal d'optimitzar al màxim l'exposició a la hipòxia.

1.7 CAMBRES HIPOBÀRIQUES

Per tal de poder simular els efectes de la hipòxia intermitent disposem de les cambres hipobàriques. Aquestes cambres permeten reproduir en un laboratori les condicions ambientals de baixa pressió atmosfèrica que es troben a gran altura. Aquesta baixa pressió atmosfèrica provoca una disminució de la pressió parcial d'oxigen en els alvèols pulmonars (en l'atmosfera sempre es manté el 20,9% d'oxigen) i, per tant, també una reducció de la pressió parcial d'oxigen en la sang arterial. Al sotmetre un individu a aquestes baixes pressions aconseguim que l'organisme desencadeni una sèrie de respostes fisiològiques similars a les que tenen lloc en altitud, com ja hem vist en l'apartat 1.2 "*Mecanismes de regulació deguts a la hipòxia*" pàg. 7 i 1.4 "*Mecanismes compensatoris*" pàg. 18.

Per aquests motius, aquesta tècnica està essent àmpliament utilitzada en animals i humans per tal d'estudiar les respostes fisiològiques a la hipòxia i a l'aclimatació en altura, aplicant-se diferents tipus de protocols d'hipòxia intermitent. Però aquesta no és la seva única utilitat, ja que les seves aplicacions són molt més àmplies: des d'aclimatacions per a expedicions a alta muntanya, fins a la millora de la condició aeròbica, passant per possibles

teràpies per augmentar el contingut d'eritropoetina, entre d'altres, com explicarem més endavant en l'apartat 1.7.4 "*Aplicacions*" pàg. 36.

1.7.1 Funcionament d'una cambra hipobàrica.

Estructuralment una cambra hipobàrica consta de 3 parts clarament diferenciades:

- 1) Un habitacle on es produirà la disminució de pressió.
- 2) Una estació de buit composta per una o més bombes i un sistema de conducció i regulació del flux.
- 3) Un sistema de control per regular la pressió a l'interior de la cambra.

1) És molt important que les parets de la cambra siguin resistents a la forta succió (pressió negativa) que es produirà sobre elles. No s'han de deformar ni trencar. És molt utilitzat l'acer en cambres per humans i un vidre gruixut o metacrilat en cambres per animals (Fig. 1.20). Aquest cubícul ha de ser d'una mida adequada per tal de poder estar en el seu interior els animals o humans d'una manera còmoda. És convenient disposar d'un sistema SAS (resclosa o cambra d'equilibri) que permeti la comunicació directa amb l'exterior sense variar la pressió a l'interior (intercanvi de material, instruments, mostres, etc.)

2) Les condicions d'hipobària s'aconsegueixen gràcies al buit produït per una bomba i una sèrie de vàlvules que permeten l'entrada de més o menys flux d'aire a l'interior de la cambra. La bomba ha de ser d'una potència i mida adient respecte a la mida de la cambra. Normalment funcionen amb la combustió d'oli industrial, però també n'hi ha d'aigua.

3) El control per al correcte funcionament de les bombes, així com el de les vàlvules, pot realitzar-se manualment mitjançant un comandament de control que permeti activar o desactivar aquests aparells independentment l'un de l'altre en funció de les necessitats. Es pot disposar d'un petit robot programable (PLC) amb funció de control, o bé es poden usar ordinadors amb programes

informàtics especialment dissenyats per a aquestes finalitats. Aquestes aplicacions permeten fixar l'altura (o pressió) desitjada, el temps que necessitem per assolir-la i després per retornar al nivell del mar. Gràcies a uns sensors a l'interior de la cambra connectats al sistema informàtic es pot conèixer el valor concret en cada moment de diferents paràmetres, com són la temperatura, humitat relativa, pressió baromètrica (altitud) pO_2 i la pCO_2 (Fig. 1.19). S'ha d'evitar que l'augment o disminució de la pressió sigui brusca, cosa que podria provocar alteracions o patologies en els subjectes experimentals. Els canvis han de ser graduals i progressius.



Figura 1.19. Comandament control que ens mostra en tot moment els valors de pressió (hPa), temperatura ($^{\circ}C$) i humitat relativa (%), que hi ha a l'interior de la cambra.

La cambra pròpiament dita pot estar equipada amb diferents accessoris:

- Una doble escotilla, que permet el pas de material de petit mida cap a dintre o cap a fora de la cambra, com podrien ser mostres, sang, aliments, etc.
- Una vàlvula d'aireig, que assegura la renovació de l'aire a l'interior de la cambra. Però s'ha d'evitar que hi hagi entrades d'aire des de l'exterior (per llocs que no sigui la vàlvula d'aireig), ja que això obliga a la bomba a treballar amb un major esforç, arribant fins i tot a no poder disminuir suficientment la pressió i provocant, a més, un xiulet molest.

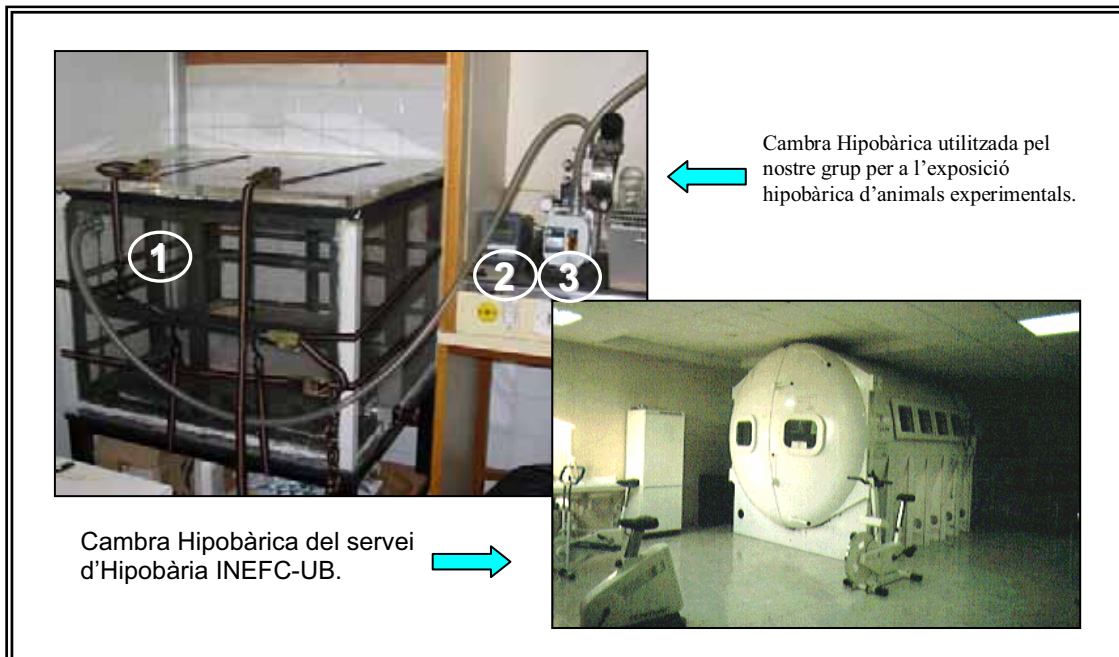


Figura 1.20. Exemple de dues cambres hipobàriques, una per a animals i l'altra per a humans.
1) Habitable; 2) Sistema de control; 3) Bomba de buit.

- Recuperació ràpida, en cas d'emergència, la cambra disposa d'una vàlvula de seguretat que pot accionar-se directament des de l'interior o de l'exterior, independentment, i que permet l'entrada d'aire de l'exterior i el ràpid descens de l'altura fins al nivell del mar. En cas d'un mal funcionament de les bombes o del sistema automàtic que produís una disminució incontrolada de la pressió atmosfèrica a l'interior de la cambra hipobàrica, aquesta està equipada amb uns discs de seguretat que es trencarien si s'arribés a una altitud simulada de 6.800 metres, amb el que es restabliria progressivament la pressió atmosfèrica fins a igualar-se amb la que hi ha a l'exterior.

1.7.2 Història de la cambra INEFC-UB

L'única cambra hipobàrica nacional d'ús civil en tot l'Estat és la que actualment es troba a l'INEFC-UB. Aquesta cambra va poder començar a construir-se amb l'ajuda del Pla Nacional d'Investigació I+D que es concedí al projecte dirigit pel Dr. Luís Palacios del Departament de Bioquímica y Fisiologia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona. Actualment la cambra es troba equipada

i disponible per a la investigació i com a servei públic per a tothom que ho precisi.

1.7.3 Aplicacions

Actualment hi ha una gran quantitat de cambres hipobàriques en funcionament (Fig. 1.21). Algunes d'aquestes són d'ús privat (en hospitals, centres militars, la majoria) i d'altres són públiques i funcionen donant un servei a tota la població que estigui interessada o que ho requereixi, com per exemple la cambra hipobàrica INEFC-UB.

Espanya:	Centre d'Instrucció de Medicina Aeroespacial, Hospital del Aire (Madrid) INEFC (Barcelona, única a Espanya d'ús civil i que funciona com a servei públic).
Alemania:	Colònia; "Institut für Luft und Raumfahrtmedizin" Munic; "Gemeinschaftspraxis für Anästhesiologie" i "Fliegerärztliche Untersuchungsstelle"
Bèlgica:	Brussel·les; "Force Aérienne. Centre de Médecine Aérospatiale"
Dinamarca:	Copenhaguen; "RIGSHOSPITALET. Copenhagen University Hospital".
Finlàndia:	Helsinki; "Research Institute of Military Medicine. Department of aviation medicine"
França:	Grenoble; "Centre d'Essais en Vol".
Japó:	Nasda; "caisson hypobare / hypobaric chamber test". Ibaraki; "caisson hypobare / hypobaric chamber test".
Països Baixos:	Soesterberg; "ROYAL NETHERLANDS AIR FORCE" i "Aeromedisch Institut".
Perú:	Lima; "Fuerza Aerea del Perú. Hospital Las Palmas"
Regne Unit:	Hampshire; "ROYAL AIR FORCE. School of Aviation Medicine" Aberdeen; "University of Aberdeen. Department of Environmental & Occupational Medicine".
Suècia:	Estocolm; "Karolinska Institutet. Section of Environmental Physiology" Linköping; "SWEDISH SPACE CORPORATION. Flight Medicine Center"
Suïssa:	Lugano; "Fliegeärztliches Institute der Luftwaffe"
Xile:	Santiago de Chile; Centro de Medicina Aeroespacial. Fuerza Aerea de Chile. Antofagasta; CETHA (Centro de Estudios del Trabajo Humano en Altura, Asociación Chilena de Seguridad).

Figura 1.21. Algunes de les cambres hipobàriques existents en l'actualitat a nivell mundial.

Les possibles aplicacions d'aquestes cambres són nombroses i variades. Cada cop es troben més possibilitats pràctiques a aquestes màquines de simulació de l'altitud.

1.7.3.1 Test de tolerància a la hipòxia

Amb aquesta prova es mesura la sensibilitat a la hipòxia, la qual està relacionada amb el risc de patir mal agut de muntanya, AMS (veure apartat 1.5 "Patologies" pàg. 24). El test consisteix en realitzar valoracions no invasives en repòs i en exercici, tant a nivell del mar, com a una altura simulada de 5.000 metres. Aquest test és recomanat per a totes aquelles persones que viatgen a llocs situats per sobre dels 3.500 metres.

1.7.3.2 Programa de pre-aclimatació per a expedicions a mitjana i gran altura

Algunes sessions d'exposició simulada a l'altitud provoquen un augment de la massa eritrocitària, així com de la secreció de l'eritropoetina (Rodríguez et al., 1999; 2000) i canvis primaris en el patró ventilatori. Aquests programes poden ser útils per escurçar els períodes d'aclimatació a gran altura, com també per reduir els costos de l'expedició i augmentar les opcions d'èxit (Richalet et al., 1992; Casas et al., 2000; Ricart et al., 2000). També pot ser utilitzada per motius d'oci: turistes a zones de gran altitud com l'Aconcagua o l'Himàlaia o per practicar muntanyisme, trekking, alpinisme, esquí, etc.

1.7.3.3 Millora del rendiment físic. Programa d'exposició a hipòxia intermitent

Com en el cas anterior, l'exposició continuada a hipòxia hipobàrica intermitent permet unes respostes adaptatives a nivell respiratori, hematològic i cardiovascular, fent augmentar la capacitat de treball aeròbic (Rodríguez et al., 1999; Casas et al., 2001). Aquests programes són idonis per a l'entrenament a nivell del mar de competicions que s'han de realitzar en altura. També són útils per esports on es requereix una bona capacitat aeròbica o de resistència, com

podrien ser triatló, ciclisme, carreres de llarga distància, etc. En aquest cas els entrenaments són en altura simulada per a la millora del rendiment a nivell del mar (Neubauer, 2001).

1.7.3.4 Tests tècnics

Les cambres hipobàriques també poden ser utilitzades per comprovar el funcionament a baixa pressió de determinats aparells: impressores, telefonia, ordinadors, etc. Poden ser especialment útils per a la comprovació d'equipament i accessoris de muntanya.

1.7.3.5 Estudi de malalties o situacions en que es dona hipòxia intermitent

En nombrosos països sud-americans i d'Àsia central hi ha una gran quantitat de treballadors i tècnics a mitjana o gran altura. La situació laboral d'aquests no és fàcil, ja que a part de la duresa pròpia del treball físic i de les condicions de precarietat, estan sotmesos a diferents cicles de hipòxia-normòxia, la qual cosa comporta una sèrie d'alteracions en l'organisme dels treballadors.

Hi ha diferents cicles d'hipòxia intermitent crònica:

Mines de *Perú i Bolívia*: 3 setmanes treballant en altura (3.800 m – 4.600 m), 1 setmana descansant a nivell del mar.

Mines de *Xile i Argentina*: 1 setmana treballant i 1 setmana descansant a nivell del mar.

Els individus han d'estar en òptimes condicions per poder rendir al màxim en el seu treball (Jalil et al., 1994; Richalet et al., 2002).

Hi ha una sèrie de malalties en que es produeix hipòxia intermitent (veure 1.6.1 "*Hipòxia intermitent en la vida real*", pàg. 29), que gràcies a la cambra hipobàrica es poden realitzar diferents estudis, ja que és un model útil per a intentar simular les mateixes condicions.

1.7.3.6 Medicina aeroespacial, simulació de vols i caigudes lliures o amb paracaigudes. Permanència en estacions orbitals

Sobretot en aplicacions militars per tal de simular les condicions ambientals que es donen durant els descens en paracaigudes i en els vols, tant d'avions com de naus espacials (Sicard et al., 2001; 2003).

Estacions orbitals MIR, ISS, pressuritzades a 2.000 metres aproximadament. Possiblement, també futures colònies extra planetàries.

1.7.3.7 Futures aplicacions

Diverses aplicacions clíniques poden ser tractades en un futur pròxim amb hipòxia intermitent com a complement o substitució de les teràpies tradicionals.

- Els **malalts dialitzats** se'ls hi administra EPO exògena periòdicament. Amb exposicions d'hipòxia serien els propis pacients qui sintetitzarien la seva pròpia EPO sense necessitat d'injeccions diàries ni de productes farmacològics.
- Hi ha estudis actuals que demostren el paper **neuroprotector de l'Eritropoetina** (Ehrenreich & Siren, 2001; Siren & Ehrenreich, 2001; Ehrenreich et al., 2002). La seva acció evitaria o previndria la pèrdua patològica neuronal a nivell del sistema nerviós central. Pot ser molt útil en nombroses malalties de gran incidència actual, com poden ser: embòlies, neurotraumes, neuroinflamacions, malalties neurodegeneratives (Parkinson, Alzheimer, esclerosi lateral amiotròfica, etc.) i patologies psiquiàtriques com l'esquizofrènia (Ehrenreich et al., 2004). L'EPO s'expressa en el sistema nerviós central humà (a part del ronyó), i s'ha demostrat en cultius cel·lulars i en models d'animals malalts tenir un caràcter neuroprotector. Els seus efectes beneficiosos són varis: antiapoptòtic, neurotròfic, antioxidant i angiogènic. La seva secreció (com ja hem dit anteriorment en 1.3.3 "EPO" pàg. 17), és estimulada per la hipòxia, via HIF-1, fet que aconseguim amb

l'exposició a hipòxia intermitent en la cambra hipobàrica. També és administrada en condicions de quimioteràpia, en tractaments tumorals, per protegir els pacients de l'anèmia associada a aquesta teràpia (Harris, 2002).

- Paper **neuroprotector de la neuroglobina** (tot i que s'explicarà més detalladament en l'apartat 1.8.3.3.1 "*Neuroglobina*" pàg. 56, ara la descriurem breument).

La neuroglobina és una globina monomèrica identificada recentment en vertebrats que uneix O₂ i s'expressa en les neurones cerebrals (Zhu et al., 2002). S'ha observat que la hipòxia i la isquèmia estimulen la secreció de la neuroglobina i protegeixen les neurones del dany hipòxic (Garry & Mammen, 2003; Sun et al., 2003).

- Utilització com a **protector en els trasplantaments i intervencions quirúrgiques**. S'està estudiant l'exposició de les cèl·lules a un preconditionament Isquèmia-Reperfusió. Aquestes obtenen una protecció, un retard en l'apoptosi, augmentant per tant, la viabilitat de les cèl·lules i el grau d'èxit de l'operació. Per altra banda també s'augmenta el grau d'angiogènesi (Tkatchouk, 1993; Xie et al., 1997; Alegret et al., 2000; Corno et al., 2002).
- S'està estudiant l'efecte protector de la hipòxia intermitent respecte la **tolerància a isquèmies arrítmiques**. Aquest mecanisme podria ser utilitzat com a prevenció d'isquèmies en persones amb antecedents familiars d'infarts o en persones amb un alt risc de patir-los (Asemu et al., 1999; Bailey et al., 2001; Milano et al., 2002), així com el paper cardioprotector que podria desenvolupar la mioglobina (Mammen et al., 2003). També s'ha vist que l'entrenament, tant en hipòxia com en normòxia, redueix les concentracions d'àcids grassos lliures, de colesterol total, d'HDL-colesterol i LDL-colesterol. Però només amb l'exercici i amb condicions d'hipòxia s'aconsegueix reduir les concentracions d'hemocisteïna, aminoàcid implicat

en les malalties coronàries. I encara més, la pressió sanguínia sistòlica màxima fou reduïda després de l'entrenament en hipòxia, indicant un efecte hipotensiu. Amb aquests resultats, els autors conclouen que l'entrenament en hipòxia podria ser beneficiós per als pacients amb problemes cardiovasculars (Bailey et al., 2000).

- En condicions d'altura hi ha una tendència a **augmentar el metabolisme basal**. Es pot emprar la cambra hipobàrica com a tractament complementari en dietes i programes d'exercicis dedicats a persones obeses o amb sobreprès (Fedorova et al., 2003).
- En determinats **tractaments antitumorals** (Folkman, 1995a,b) s'utilitzen radiacions ionitzants per tal d'eliminar les cèl·lules canceroses. El problema d'aquestes radiacions és que, a part d'afectar principalment a les cèl·lules malignes (ja que són més sensibles), també afecten als teixits no patològics. Amb la hipòxia és pot aconseguir augmentar l'efecte d'una mateixa dosi de la radiació sense augmentar la toxicitat als teixits sans, degut a que en hipòxia les cèl·lules sanes són menys radiosensibles.
En contraposició s'ha descrit que el HIF-1 podria ser una diana clau per al tractament de cèl·lules tumorals (Unruh et al., 2003). Certs estudis han demostrat que la hipòxia afavoriria un fenotipus cancerigen més agressiu (Axelson et al., 2005) i una estimulació de la progressió (Harris, 2002).

1.8 Interès de l'estudi

El nostre grup havia realitzat prèviament estudis en humans per tal de detectar possibles canvis fisiològics deguts a la hipòxia hipobàrica intermitent i per establir un protocol vàlid per a l'aclimatació a mitjana i gran altura, així com per a la millora de la resistència aeròbica (Rodríguez et al., 1999; Casas et al., 2000; Ricart et al., 2000). Aquests estudis eren de caràcter no invasiu i es centraven bàsicament en respostes a nivell respiratori, amb mesures ergoespiromètriques, i a nivell sanguini, amb anàlisis hematològics complets (Rodríguez et al., 2000; Casas et al., 2001).

Per tal de poder estudiar possibles respostes en l'intercanvi perifèric i estudiar els canvis produïts a nivell cel·lular, vàrem optar per fer estudis invasius. Evidentment aquests estudis no es podien realitzar amb éssers humans, per la qual cosa es van procedir a realitzar amb animals d'experimentació.

Fins reproduir els resultats obtinguts en humans va ser necessari posar en pràctica una gran quantitat de dissenys experimentals i estudis previs per tal de comprovar que amb el nostre protocol experimental d'hipòxia hipobàrica intermitent es produïen canvis a nivell hematològics similars als d'humans (eritropoesi, amb augment d'hematòcrit i hemoglobina). Aquest protocol provocà una variació dels paràmetres hematològics indicadors del subministrament d'oxigen als teixits per tal d'afavorir una major aportació d'aquest, i per tant, ens feu pensar que també podrien haver canvis a nivell perifèric o muscular. Després de que el model i protocol d'exposició van quedar ben establerts es va iniciar aquest estudi.

A continuació es detallen les mostres animals utilitzades, el per què i les dos grans línies d'estudi que es van desenvolupar en aquesta tesi: la histoquímica (HQ) i la bioquímica (BQ).

1.8.1 Mostres de l'estudi

S'estudiaren 3 tipus de mostres musculars degut a les diferents característiques funcionals, d'activitat i de composició dels teixits escollits.

Descripció de les mostres

1.8.1.1 Miocardi (MIO)

El cor, òrgan situat a la meitat esquerra de la caixa toràcica i sobre el diafragma, histològicament consta de 4 capes (Fig. 1.21):

Pericardi: sac membranós que envolta el cor.

Epicardi: capa externa en contacte amb el pericardi.

Miocardi: és el múscul cardíac pròpiament dit.

Endocardi: capa interna en contacte amb la sang.

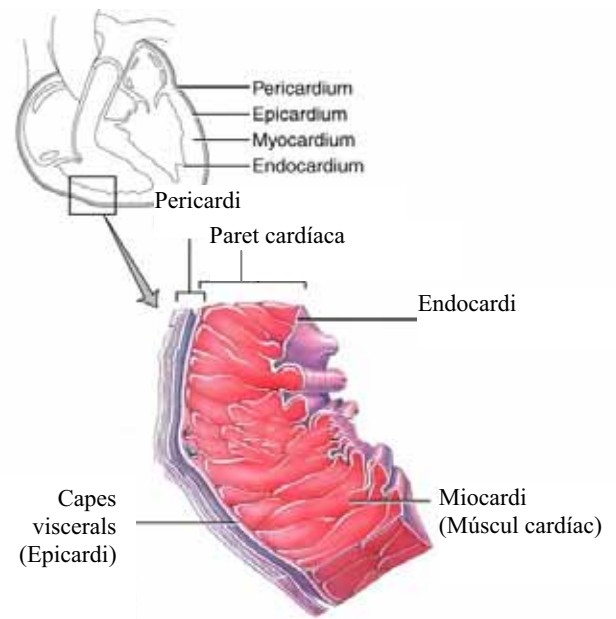


Figura 1.21. Tall longitudinal del pericardi i paret del ventricle dret amb les diferents capes que el formen.

Les fibres del miocardi s'anomenen Working cells o W fibers (Scheuermann, 1992) i són totes iguals des del punt de vista histològic. Al realitzar l'assaig

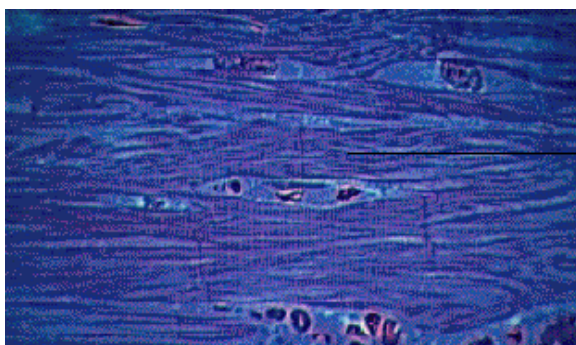


Figura 1.22. Miocardi teñit amb la tècnica SDH. Nachlas et al., 1957.

histoquímic per a la succinat deshidrogenasa, SDH (Nachlas et al., 1957), explicada detalladament en l'apartat 3.3.2.1 de "*Mètode SDH*" pàg. 77, s'aprecià una forta tinció, que demostrà que aquest teixit és completament aeròbic, amb una gran capacitat oxidativa (Fig. 1.22). És un

múscul que està actiu constitutivament i per tant la seva activitat és alta. És útil per tal d'estudiar variacions en una musculatura activada de manera contínua i amb totes les fibres del mateix tipus metabòlic.

1.8.1.2 Diafragma (DFG)

Múscul esquelètic principal responsable de la inspiració i considerat el múscul ventilatori més important en els mamífers (Sieck, 1988). En realitat podem distingir dues grans regions ben diferenciades embriològicament,

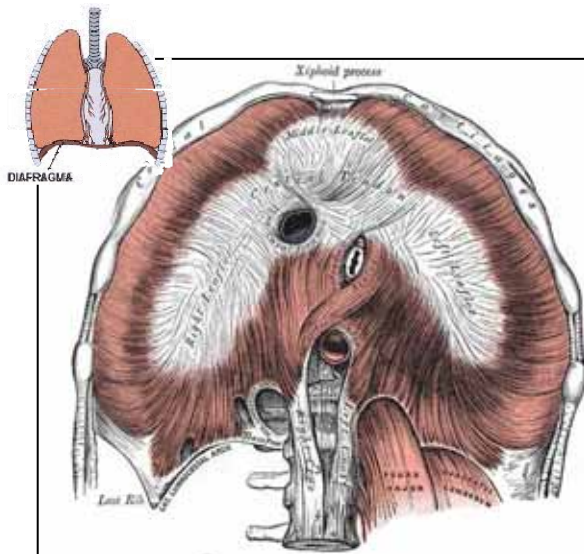


Fig. 1.23. Cantó esquerre: visió frontal del DFG. Figura principal: visió inferior del DFG i de la regió a estudiar.

anatòmicament i funcionalment: el diafragma costal i el diafragma crural (Detroyer & Estenne, 1988; Powers et al., 1990; Sugiura et al., 1992; Hodge et al., 1997). El *diafragma costal* es forma en el tendó central i s'insereix a l'apèndix xifoides (fibres externals) i porció interna de les últimes 6 costelles inferiors. La major part de les fibres s'orienten radialment en sentit longitudinal de dalt a baix (Whitelaw, 1987). D'aquesta regió en varem fer

l'estudi (Fig. 1.23). El *diafragma crural* s'origina en el tendó central i s'insereix en les 3 primeres vèrtebres lumbars. La disposició de les seves fibres no és tan homogènia, amb fibres amb orientació radial i d'altres que s'entrecreuen a nivell del hiatus esòfag inferior (Mittal et al., 1988).

Està activat de manera constitutiva, però a diferència del cor, consta de fibres musculars histològicament diferents: FOG (Fast oxidative glycolytic), SO (Slow oxidative) i FG (Fast glycolytic), que explicarem detalladament en 1.8.2.3 "Tipus de fibres musculars" pàg. 50. L'estudi d'aquest múscul és adient per determinar canvis en una musculatura activada constitutivament i amb diferents tipus de fibres.

1.8.1.3 Tibialis anterior (TA)

Múscul esquelètic locomotor de les extremitats inferiors situat sota el *bíceps femoris*

i sobre l'*extensor digitorum longus* (Fig. 1.24). És

un teixit compost de diferents tipus de fibres musculars (les mateixes que el diafragma). En els nostres animals és una musculatura amb

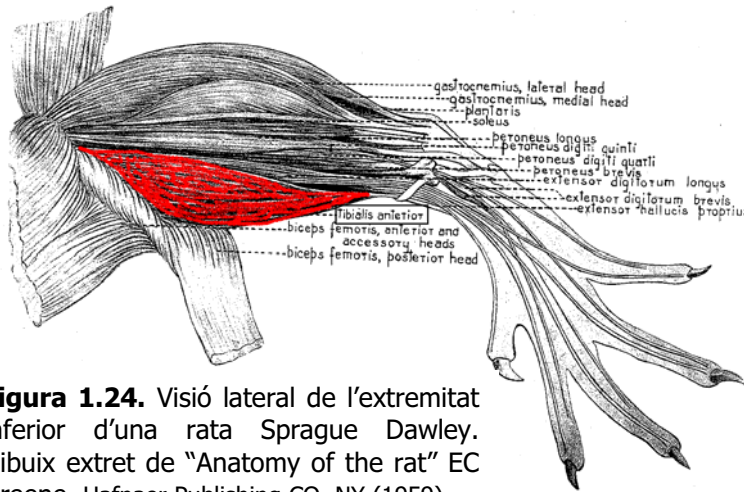


Figura 1.24. Visió lateral de l'extremitat inferior d'una rata Sprague Dawley. Dibuix extret de "Anatomy of the rat" EC Greene. Hafnaer Publishing CO, NY (1959).

poca activitat, ja que no practicaven exercici i els animals estaven confinats en un espai tancat, amb un patró de conducta sedentària.

S'utilitza per tal d'observar possibles variacions en un múscul amb diferents tipus de fibres musculars on hi ha una activitat baixa.

A continuació es mostra un quadre resum de les característiques principals dels músculs a estudiar:

Mostra	Característica	Activitat	Metabolisme	Tipus de Fibres
<i>Tibialis anterior</i>	Locomotor (Extremitats)	Baixa (Sedentari)	Oxidatiu-No Oxidatiu	SO, FOG, FG
<i>Diafragma</i>	Respiratori	Alta (Constitutiu)	Oxidatiu-No Oxidatiu	SO, FOG, FG
<i>Miocardí</i>	Cardíac	Alta (Constitutiu)	Oxidatiu	Oxidatives

FOG: Fast Oxidative Glycolytic; **SO:** Slow Oxidative; **FG:** Fast Glycolytic.

1.8.2 Histoquímica

Per a l'estudi histològic es van emprar les diferents musculatures que acabem de descriure. Per la qual cosa, i en primera instància, explicarem l'estructura dels diferents teixits musculars i després detallarem més concretament la musculatura esquelètica, els tipus de fibres musculars i les mostres de l'estudi.

1.8.2.1 Estructura del teixit muscular

Si ens basem en l'aparença microscòpica i funció hi ha 3 tipus de teixit muscular: l'esquelètic, el cardíac i el llis.

a) Musculatura esquelètica: és la musculatura responsable de dur a terme des de la locomoció i manteniment



Fig. 1.25. Disposició jeràrquica de la musculatura esquelètica.

de la postura, en interactuar amb els tendons i el sistema esquelètic, fins a moviments més petits com el desenvolupat per la musculatura extraocular. La musculatura esquelètica constitueix aproximadament el 40% del pes corporal i està present en quasi bé la totalitat d'aquest. Està controlada de manera voluntària i conscient pel sistema nerviós central, tenint una disposició jeràrquica on les diferents estructures que el formen (Múscul-fascicle-fibra-miofibril·la) van

englobant les subseqüents (Fig. 1.25). També s'anomena *musculatura estriada* per la seva estructura característica. Aquesta és el resultat de la superposició dels filaments d'actina (bandes clares) amb els filaments de miosina (bandes fosques). Les cèl·lules individuals tenen aproximadament 50 μm de diàmetre i una longitud com la del propi múscul.

En apartats posteriors parlarem més detalladament d'aquesta musculatura.

b) Musculatura cardíaca: forma part únicament del cor i és la musculatura responsable de la contracció del miocardi. Funciona com a bomba cardíaca. També té una morfologia estriada però en aquest cas el moviment és

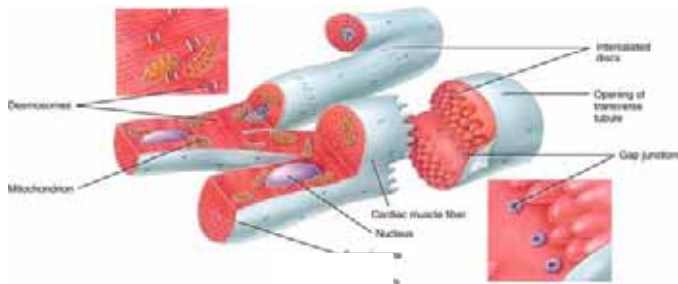


Figura 1.26. Esquema de la musculatura cardíaca i de les seves unions.

involuntari i no necessita estimulació externa per a contraure's, ja que ho fa de forma autònoma degut a un marcapàs endogen. Les fibres musculars del miocardi presenten unions molt

estretes entre sí, la qual cosa permet que els estímuls es transmetin entre cèl·lules molt ràpidament i que tot el múscul cardíac es contregui com una sola unitat (Fig. 1.26). La innervació extrínseca dels nuclis marcapassos (nòdul Sinus Auricular, SA, i Aurícolo Ventricular, AV), per mitjà del Xè nervi cranial o vague, permet modular aquesta activitat espontània.

c) Musculatura llisa: aquesta musculatura la trobem en els vasos sanguinis, on regulen la pressió arterial, en les vísceres, implicada per exemple

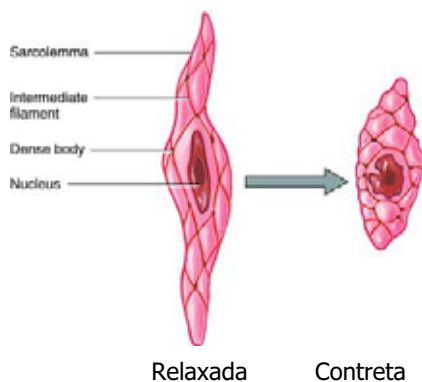


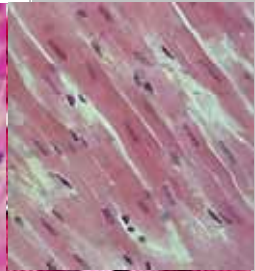
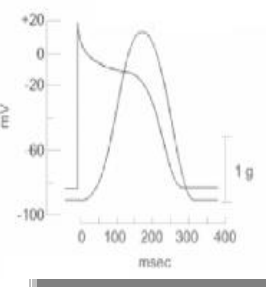
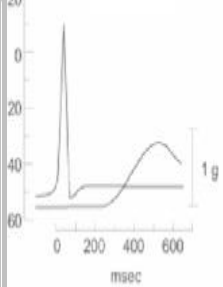
Figura 1.27. Esquema de les cèl·lules musculars llises.

en el peristaltisme de l'intestí i estómac, en l'úter i en d'altres localitzacions on les contraccions són lentes i sostingudes. Aquestes fibres funcionen de manera involuntària i/o automàtica i són més petites (50-300 μm x 5-50 μm diàmetre) que les esquelètiques, tenen forma fusiforme (ample en el centre) i són mononucleades (Fig. 1.27), a diferència de les altres

cèl·lules musculars que són polinucleades. Presenten filaments d'actina i miosina però sense estructurar-se en sarcòmers (veure més endavant 1.8.2.2 "Estructura de la musculatura esquelètica" pàg. 49), per la qual cosa no s'aprecien les estriacions. La contracció del múscul llis és molt lenta, podent-se

mantenir sense relaxar durant més temps que les anteriors, presentant una contractilitat major que qualsevol altre tipus de fibra muscular.

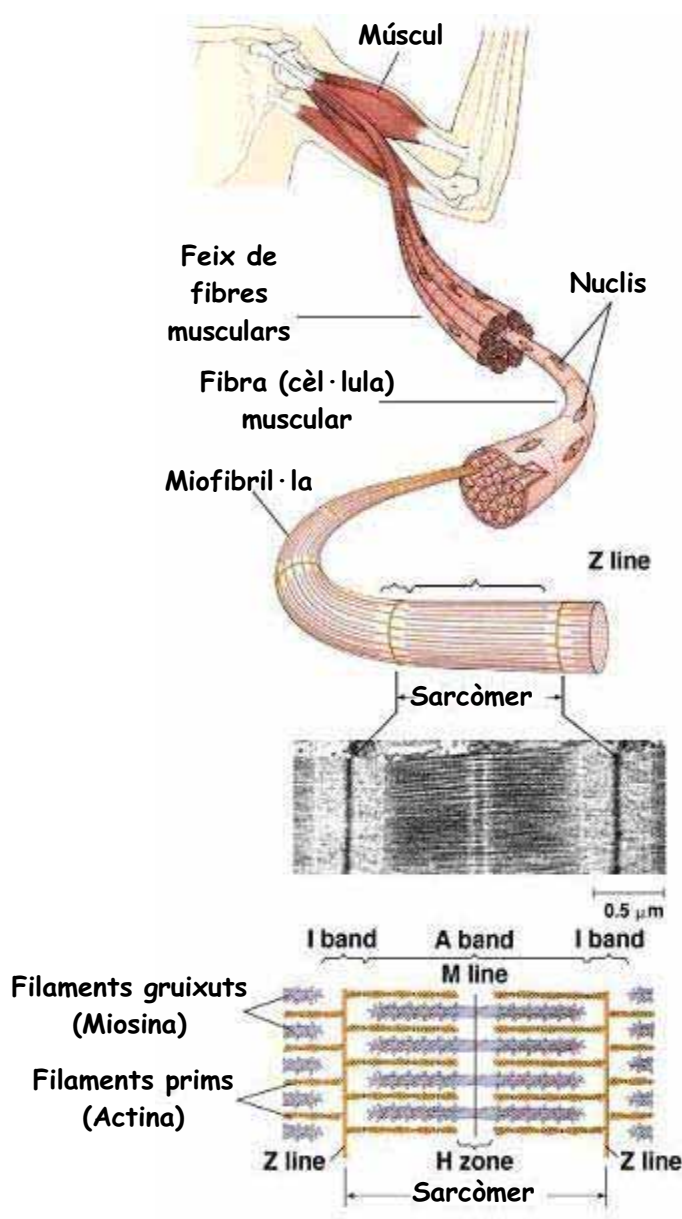
En la següent taula-resum es mostren les característiques principals dels tres tipus de musculatura descrites.

Musculatura	Esquelètica	Cardíaca	Llisa
Localització	Unit als ossos o a la pell	Parets del cor	Parets de l'estómac, úter, tubs respiratoris, vasos sanguinis i bufeta urinària
			
Funcions	Locomoció, de la postura, moviment voluntari.	Bomba cardíaca	Regulació del flux sanguini per variacions diàmetre dels vasos, peristaltisme. Mescla l'aliment en l'estómac
			

1.8.2.2 Estructura de la musculatura esquelètica

Aquest teixit s'estructura en fascicles compostos per varis centenars de cèl·lules musculars anomenades **fibres**, pel seu aspecte cilíndric i allargat (Fig. 1.28). Cada fibra està rodejada per un nombre variable de capil·lars sanguinis que proporcionen a la fibra: oxigen, nutrients, metabòlits i altres factors necessaris per a la realització de les funcions metabòliques. També eliminen molècules del metabolisme secundari i/o de rebuig, com el CO₂.

Les fibres musculars esquelètiques són multinucleades i posseeixen en el seu



interior paquets de proteïnes contràctils denominats **miofibril·les** (Fig. 1.28). La interacció i distribució superposada dels dos tipus principals de proteïnes contràctils (filaments d'**actina** i de **miosina**, aquesta darrera formada per cadenes pesades i cadenes lleugeres) en determina la morfologia típica de bandes clares i fosques (Fig. 1.28) i en darrer lloc, la contracció muscular. La unitat bàsica de contracció muscular és el **sarcòmer** (Fig. 1.28). Aquesta unitat de contracció és la regió que hi ha entre dos línies Z, lloc on s'insereixen els filaments d'actina.

Totes les fibres musculars estan innervades per neurofibril·les, que són les ramificacions dels axons de les fibres nervioses motores que

Figura 1.28. Estructura musculatura esquelètica
Addison Wesley Longman, Inc ©1999.

provenen de la medul·la espinal. El conjunt format per axó i les fibres musculars que innerva es denomina **unitat motora**, així com al punt concret de contacte entre l'axó i la fibra muscular es denomina **placa motora** (Fig. 1.29).

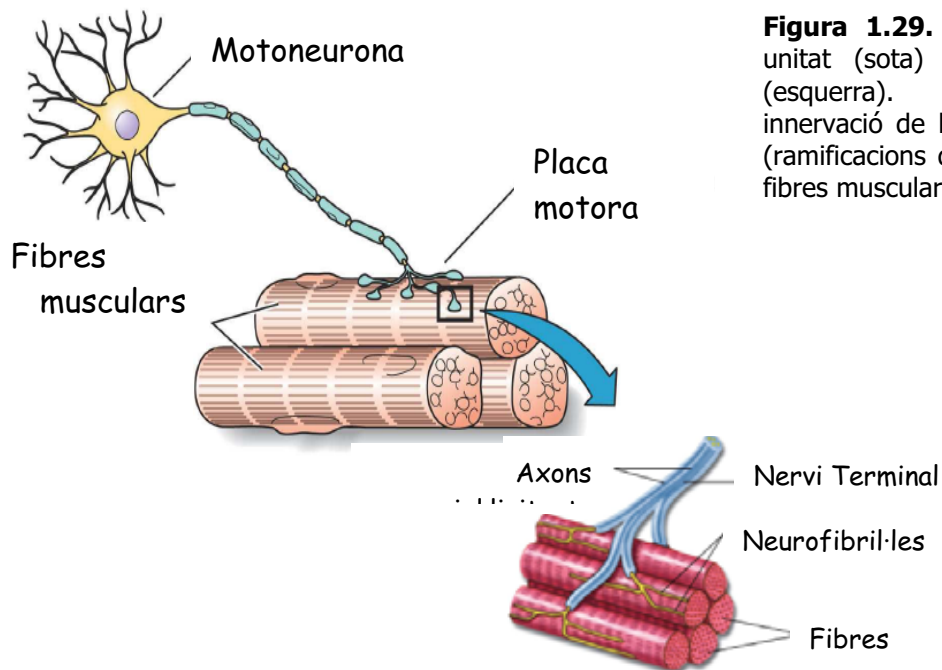


Figura 1.29. Esquema de la unitat (sota) i placa motora (esquerra). Apreciem la innervació de les neurofibril·les (ramificacions dels axons) a les fibres musculars.

1.8.2.3 Tipus de fibres musculars

Els esquemes de tipificació basats en la sensibilitat de la m-ATPasa a diferents pH i en els diferents perfils metabòlics i enzimàtics (tècnica detallada en la pàg. 79) s'han convertit en una pràctica estàndard que mostra una gran correspondència entre tipus de fibres i tipus d'unitats motores (Pette & Staron, 1990). Utilitzant l'activitat de diferents enzims a partir de determinacions bioquímiques (Peter et al., 1972), es classifiquen les fibres musculars de mamífers en 3 tipus bàsics: **SO** (*Slow Oxidative*), **FOG** (*Fast Oxidative Glycolytic*) i **FG** (*Fast Glycolytic*), les característiques principals de les quals es troben a la taula 1.2 (pàgina següent). Aquesta nomenclatura ha tingut una gran acceptació en l'estudi de la fisiologia del múscul esquelètic, ja que atribueix a cada tipus de fibra unes característiques metabòliques que posteriorment s'han demostrat estar relacionades amb les propietats fisiològiques de les diferents unitats motores (Burke et al., 1971; 1973; 1974).

Una altra possible classificació es basa en les isoformes de la cadena pesada de la miosina (*Myosin Heavy-Chain*, MHC). Podent-se expressar una sola isoforma o coexpressar-se amb d'altres en una mateixa fibra muscular. S'ha demostrat que la velocitat de contracció de cada fibra muscular depèn del contingut relatiu d'aquestes isoformes MHC (Pette & Staron, 1990; Bottinelli et al., 1991; Schiaffino & Reggiani, 1994; 1996).

Tipus de Fibra	Funcions	Metabolisme	Fatiga	Contracció
SO	De la postura, exercici sostingut	Oxidatiu, aeròbic	Resistent	Lenta
FOG	Exercici sostingut	Mixt, areòbic	Intermèdia	Ràpida
FG	Moviments ràpids i intensos, <i>sprints</i>	Glicolític, anaeròbic	Fatigosa	Ràpida

Taula 1.2. Característiques principals dels diferents tipus de fibres musculars en mamífers.

1.8.3 Bioquímica

Utilitzant les mateixes mostres (explicat més detalladament en l'apartat 3.2 "Mostres" pàg. 73) també vàrem analitzar l'activitat de diferents enzims (lactat deshidrogenasa i citrat sintasa) i diferents concentracions de proteïnes (mioglobina i proteïnes totals).

En l'últim apartat d'aquesta secció també expliquem breument la neuroglobina, ja que és un dels objectius a estudiar pel nostre grup en un futur proper.

1.8.3.1 Anàlisi de l'activitat enzimàtica del lactat deshidrogenasa, EC 1.1.1.27 (Beutler, 1977)

El **Lactat Deshidrogenasa (LDH)** és un enzim citosòlic glicolític utilitzat com a marcador del metabolisme anaeròbic, que catalitza la reducció del piruvat a lactat produint una important quantitat de NAD^+ per a la viabilitat de la glicòlisi anaeròbica (Fig. 1.30).

Encara que no sigui un enzim limitant en la glicòlisi, l'activitat LDH s'ha vist que és més alta en teixits amb alta capacitat glicolítica i que aquesta està altament correlacionada amb l'activitat fosfofructoquinasa (Moore & Gollnick, 1982). Estructuralment és una proteïna tetramèrica formada per dos subunitats de 35 kDa cada una, anomenades M i H, les quals tenen petites diferències en la seqüència aminoacídica. Les diferents formes moleculars dels enzims són anomenats isoenzims o isozims. Les

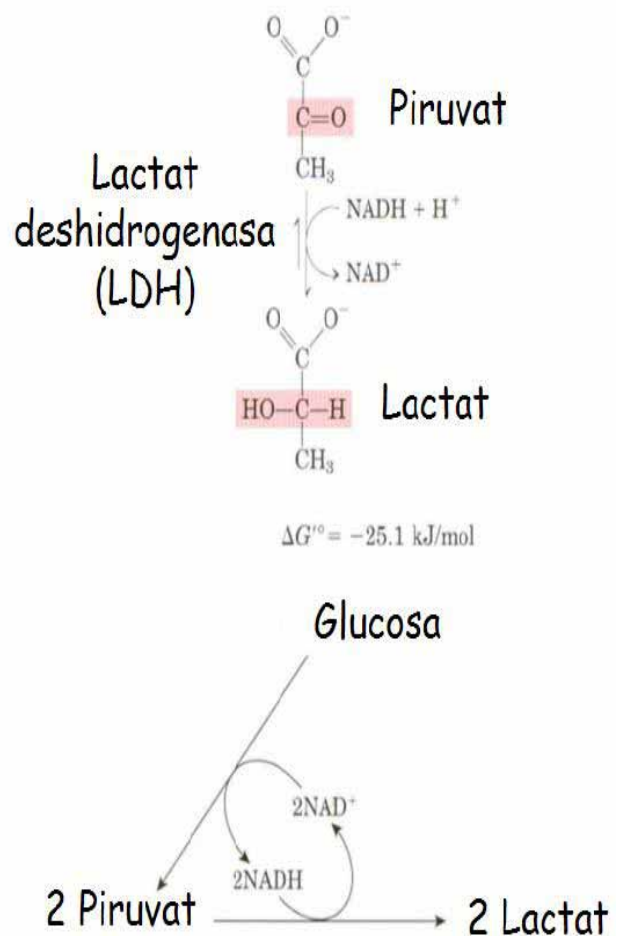
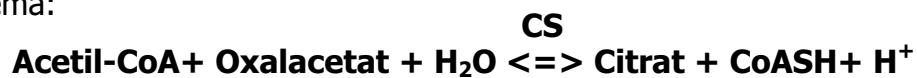


Figura 1.30. Esquema de la reacció del Lactat deshidrogenasa (LDH).

subunitats M (Muscle) són més abundants en els músculs esquelètics glicolítics, en el fetge i en ambients anaeròbics, guiant la producció del lactat a partir del piruvat. En canvi, la subunitat H (Heart) predomina en el cor i funciona principalment en condicions aeròbiques per convertir lactat a piruvat. Les subunitats M i H es combinen aleatòriament una amb l'altra per donar les 5 majors isoformes: M4, M3H, 2MH2, MH3 i H4. La composició en cada teixit ve determinada principalment per les activitats dels gens específics de les dues subunitats (Daneshrad et al., 2000; 2003).

1.8.3.2 Anàlisi de l'activitat enzimàtica del citrat sintasa, EC 4.1.3.7 (Srere, 1969)

El **citrat sintasa (CS)** és un enzim de la matriu mitocondrial que forma part del cicle de Krebs o cicle de l'àcid cítric. Aquest cicle en les cèl·lules aeròbiques és la ruta comú final del catabolisme oxidatiu de totes les molècules combustibles. En concret, el CS catalitza la condensació de l'acetil CoA i oxalacetat (OAA) per formar citrat (Figura 1.31), tal i com veiem en el següent esquema:



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, abans esmentat. És fortament inhibït per ATP en la majoria dels organismes i s'usa molt àmpliament com a marcador de la capacitat oxidativa, respiratòria o de la

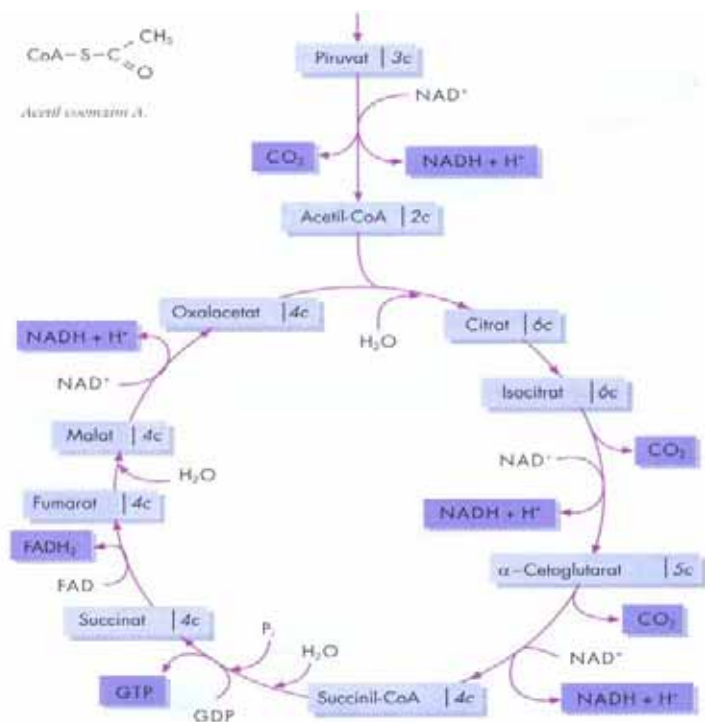


Figura 1.31. Esquema del cicle de Krebs o de l'àcid cítric.

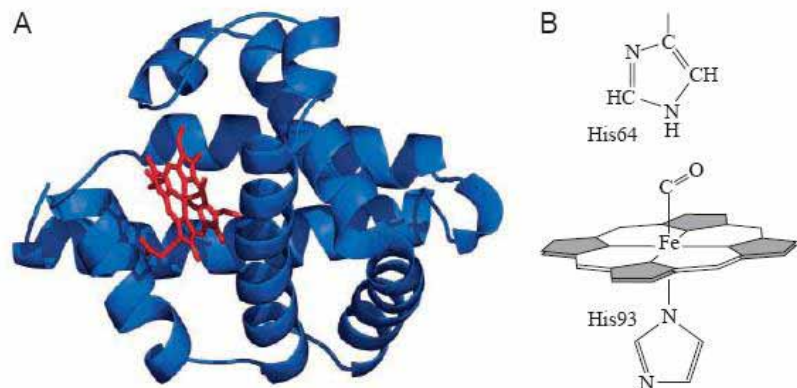
maquinària mitocondrial (Daneshrad et al., 2000; Siu et al., 2003).

El CS dels mamífers consta de dos subunitats idèntiques de 49 kDa cada una. Els dos centres actius, que són independents, estan localitzats en la interfase i formen un domini gran i un altre de petit en la subunitat. Aquest enzim presenta grans canvis conformacionals durant la catàlisi.

1.8.3.3 Mioglobina

La mioglobina és una abundant hemoproteïna citoplasmàtica (PM: 17,6 kDa) expressada exclusivament en el múscul esquelètic i cardíac. Formada per una sola cadena polipeptídica de 154 aminoàcids, conté un grup prostètic Hem (en forma de ferro acomplexada amb protoporfirina IX) responsable de la unió reversible de l'oxigen. Fou la primera proteïna cristal·lografiada per raigs X i el seu esquelet consisteix en vuit hèlix- α que envolten el domini central en que es

Figura 1.32. La mioglobina consisteix en un esquelet i en un grup protètic Hem. A) Esquelet consisteix en vuit hèlix- α que envolten el domini central en que es troba el grup Hem, el qual és responsable de la unió a l'O₂, CO i NO. B) El grup prostètic Hem és estabilitzat pels residus d'histidina superior (His 64) i inferior (His93). Extret d' Ordway & Garry, 2004.



troba el grup Hem, el qual és responsable de la unió a l'O₂, CO i NO, Fig. 1.32A (Kanatous & Garry, 2006).

Tant l'hemoglobina com la mioglobina són proteïnes de la família de les globines, encarregades en portar a terme les funcions especialitzades del transport i emmagatzematge d'oxigen en els animals, sobretot en els adaptats al busseig i a l'altura, com també és dinàmicament regulada en l'exercici (Kanatous & Garry, 2006). Però mentre que l'hemoglobina és tetramèrica (té 4 centres d'unió per a l'oxigen), la mioglobina és monomèrica (només disposa d'un centre d'unió per a l'oxigen), d'aquí la diferència en la cinètica d'afinitat en

vers l'oxigen (% Saturació d'O₂): la mioglobina té una corba en forma hiperbòlica, en canvi en l'hemoglobina és sigmoïdal (Fig. 1.33).

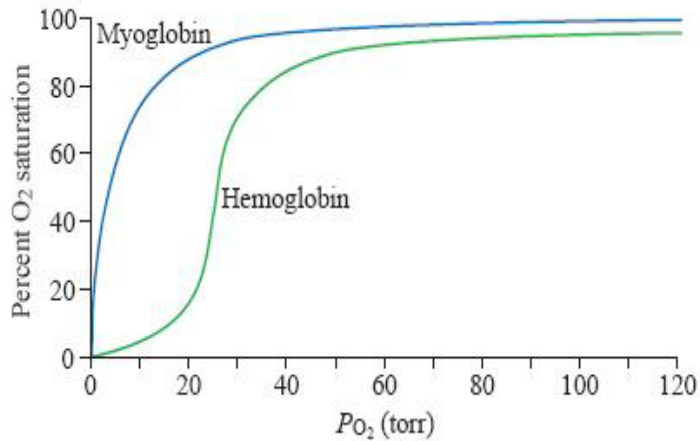


Figura 1.33. Mioglobina i hemoglobina funcionen com a transportadors i emmagatzemadors d'O₂. La mioglobina té una cinètica d'unió a l'O₂ hiperbòlica, mentre que l'hemoglobina té una corba sigmoïdal. (Gràfica extreta d'Ordway & Garry, 2004).

La mioglobina rep l'O₂ de l'hemoglobina circulant pel torrent sanguini a nivell del sarcolema i llavors el transfereix a les mitocondries (Wittenberg & Wittenberg, 2003), sobretot quan els requeriments d'O₂ són elevats o els valors d'aquest són baixos (hipòxia o anòxia). Així doncs, s'ha associat la concentració de mioglobina amb l'activitat enzimàtica mitocondrial (Masuda et al., 1999). Però també serveix de reservori i amortidor per tal d'assegurar una concentració d'O₂ relativament constant a l'interior de la cèl·lula, ja que els animals han de mantenir una mínima i necessària aportació d'oxigen cap a les seves cèl·lules (Ordway & Garry, 2004).

Altres funcions (Fig. 1.34) addicionals de la mioglobina seria limitar l'efecte tòxic de les espècies d'oxigen reactives (ROS) degut a la seva activitat peroxidasa (Garry & Mammen, 2003). Una altra important finalitat seria unir-se a l'òxid nítric (NO) i evitar el dany mitocondrial, ja que aquesta molècula inhibeix la citocrom c-oxidasa (Brunori, 2001a; b).

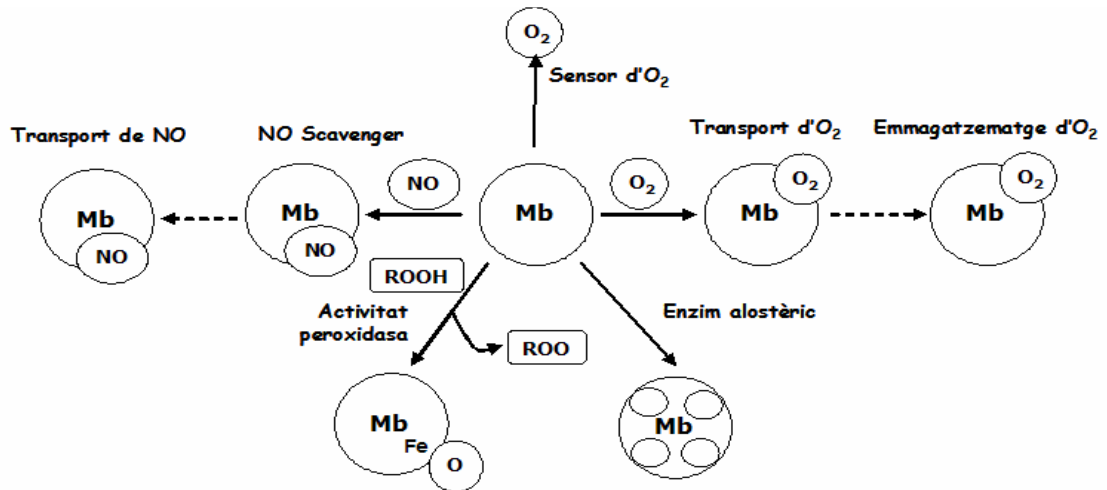


Figura 1.34. Principals funcions de la mioglobina.
(Basat en l'article de Garry et al., 2003).

1.8.3.3.1 NEUROGLOBINA

Recentment s'han trobat altres globines tissulars en els vertebrats (Fig. 1.35). Una de les més importants de les quals podria ser la neuroglobina (Burmester & Hankeln, 2004), expressada principalment en determinades regions focals del cervell i en relatives baixes concentracions: 0,01% proteïna total ó $<1\mu\text{M}$ (Garry et al., 2002).

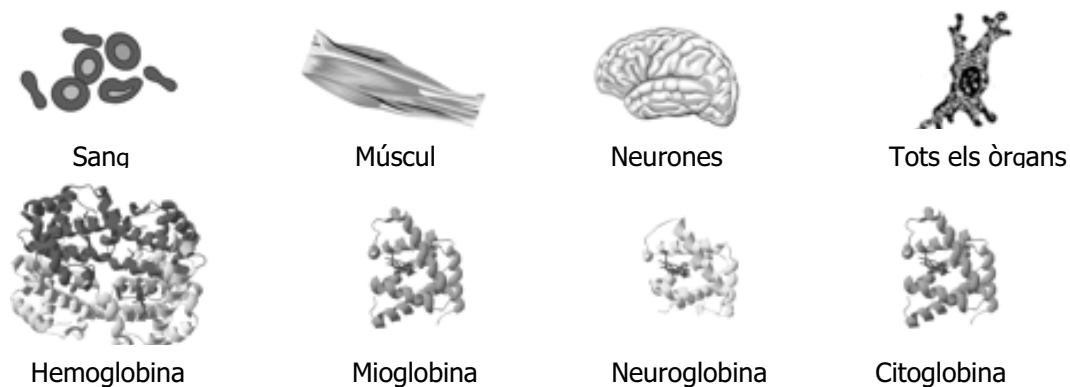


Figura 1.35. Distribució tissular de les diferents globines dels vertebrats.
Modificat de Burmester & Hankeln 2004.

Tot i només compartir el 21% i el 25% de la seqüència aminoacídica amb l'hemoglobina i la mioglobina, conserva els residus aminoacídics claus per a la unió a l' O_2 (Zhu et al., 2002). El fet que l'expressió de la neuroglobina no

augmenti en condicions cròniques d'hipòxia (Garry et al., 2002), fa pensar que aquestes globines actuarien només en la fase aguda d'hipòxia per tal de preservar la viabilitat neuronal. Aquest fet podria tenir implicacions en el tractament d'accidents vasculars del cervell (Garry & Mammen, 2003). La teoria de la neuroprotecció pren força si tenim en compte que augments en la concentració de neuroglobina fan disminuir la mida de l'infart cerebral provocat als animals experimentals (Sun et al., 2003). Per altra banda, el fet que el NO s'uneixi a la neuroglobina és d'importància cabdal, ja que aquest competeix amb l'O₂ per la unió a la citocrom c-oxidasa, i per tant, inhibeix la respiració. Així doncs, aquesta hemoproteïna funcionaria més com un modulador de NO i/o sensor d'oxigen i no tant com un mediador del transport o emmagatzematge d'aquest (Garry & Mammen, 2003).

Una altra globina recentment descoberta i relacionada amb la mioglobina i neuroglobina és la citoglobina, la funció de la qual encara és més desconeguda. Es troba en el citoplasma d'un ampli ventall de cèl·lules de diferents tipus, com el cor, el fetge i el teixit ossi. En situacions d'hipòxia també hi ha un increment de l'expressió d'aquesta proteïna i es creu que podria estar involucrada en la síntesi del col·lagen. De totes maneres, també s'ha localitzat en el citoplasma i nucli de les neurones, per la qual cosa és possible que tingui funcions també a nivell dels teixits neuronals (Schmidt et al., 2004).

1.8.3.4 Proteïnes Totals

Determinarem també el contingut total de proteïnes en les diferents mostres. Aquesta informació ens serà molt útil per tal d'avaluar correctament els possibles canvis que es donin en les activitats enzimàtiques i en la concentració de mioglobina, ja que sinó sabéssim si hi ha alteracions en la concentració total de proteïnes podríem deduir erròniament modificacions que serien degudes al contingut total proteic i no a l'específic d'un enzim o d'una proteïna concreta.

1.8.3.5 Hematologia

Un dels aspectes més coneguts de l'aclimatació a l'altura és l'augment de cèl·lules vermelles (RBC) per unitat de volum sanguini, l'increment de la concentració d'hemoglobina (Hb) i de l'hematòcrit (Hct). Aquest fet s'aconsegueix inicialment per la reducció del volum plasmàtic i després per l'increment de la massa cel·lular de la línia vermella. La hipòxia estimula la secreció d'EPO (apartat 1.3.3 "EPO" pàg. 17), la qual a la seva vegada afavoreix l'augment de les cèl·lules vermelles per estimulació del moll de l'os. El gen de l'EPO és induït per la hipòxia mitjançant el factor d'hipòxia induïble (veure apartat 1.3.1 "HIF-1" pàg. 14). Encara que els nivells d'EPO incrementen en qüestió de poques hores, l'augment de RBC tarda unes setmanes i solament arriba a un estat estable uns 6 mesos després. El volum plasmàtic és restaurat a nivell del mar fins a valors basals després de poques setmanes. L'augment de la concentració d'Hb és quasi lineal amb l'altitud i similar en habitants a nivell del mar (*lowlanders*) que en residents a gran altitud, encara que hi ha una gran variació individual. Les evidències conegudes són que els Tibetans tenen nivells d'Hb superiors als residents als Andes a una altura similar. La policitemia extrema entre residents en altura o *lowlanders* habitant en altitud durant anys, és considerat patològic i malaltia crònica de muntanya (Ward et al., 2000).

En els nostres estudis previs era important trobar aquestes respostes aclimatatives beneficioses en els paràmetres hematològics que indiquessin un major transport d'O₂, ja que implicaria un augment de la demanda per part dels teixits i faria pensar en la possibilitat dels canvis a nivell muscular. Sense aquest augment de la necessitat per part dels teixits no tindria sentit augmentar el transport d'O₂. És per aquesta raó que es va fer un seguiment dels canvis en la línia roja en tots els grups estudiats.