



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

7 RESUMS

“Una síntesi val per deu anàlisis”.

Eugeni d'Ors i Rovira (1881-1954), un dels pilars del noucentisme i modernisme català.

7.1 Resum Català

INTRODUCCIÓ

L'objectiu d'aquest estudi és aprofundir en els mecanismes bàsics d'**aclimatació** a nivell perifèric induïts per la hipòxia **hipobàrica** intermitent (**HHI**). El nostre grup va descriure en humans protocols eficaços per a la **aclimatació** a mitjana i gran altura i per a la millora del rendiment físic (Casas et al., 2000; Ricart et al., 2000; Rodríguez et al., 1999). Aquests estudis van ser realitzats en éssers humans, tenien un caràcter no **invasiu** i es focalitzaven bàsicament en les respostes respiratòries i cardiovasculars centrals, mitjançant el monitoratge de paràmetres **ergoespiromètrics** i anàlisis **hematològics** i bioquímics plasmàtics complets (Casas et al., 2001; Rodríguez et al., 2001). Basant-nos en el principi de **simmorfosi** (formació d'elements estructurals orientada a satisfer, però no excedir, els requeriments funcionals) formulat per Taylor i Weibel en 1981, podem plantejar la hipòtesi que aquestes respostes aclimatatives a nivell central han d'estar acompanyades per altres alteracions en la **vascularització** i en el caràcter **oxidatiu** en territoris perifèrics, especialment en el teixit muscular. Per a contrastar aquesta hipòtesi és necessari realitzar una anàlisi de les possibles respostes enfront de la **HHI** en l'intercanvi perifèric de gasos i altres possibles modificacions a nivell cel·lular. Per això, decidírem realitzar estudis **invasius** a nivell del **miocardi (MIO)**, del diafragma (**DFG**) i del **tibialis anterior (TA)**. Es van escollir aquests músculs (**MIO** i **DFG**) a causa de la importància que tenen en la fisiologia de l'organisme, i sobretot en la **hipòxia**, ja que en aquestes condicions augmenta la seva càrrega de treball, i també per la futura aplicabilitat mèdica i terapèutica que aquestes respostes poguessin oferir. Per altra banda es va triar el **TA** com a múscul **esquelètic** amb baixa activitat, ja que els nostres animals estaven confinats en les gàbies amb un patró de conducta sedentari. A causa de les lògiques limitacions, tant tècniques com ètiques, per a la realització d'aquest tipus d'estudi en éssers humans, es va procedir a reproduir en rates de laboratori protocols d'exposició a **hipòxia** intermitent capaces d'induir les respostes **hematològiques** descrites anteriorment en humans i, una vegada

establerts tals protocols, es va disposar d'un model experimental que ens va permetre l'estudi de l'efecte de **HHI** en l'intercanvi perifèric de gasos.

MATERIALS I MÈTODES

El nostre estudi es va desenvolupar en una doble línia principal: la **histoquímica (HQ)** i la **bioquímica (BQ)**, però també es realitzaren estudis hematològics de suport per tal de comprovar que hi havia respostes a nivell central, tal i com succeïa en els estudis anteriors amb humans. En la **HQ** es van analitzar paràmetres com la densitat capil·lar (CD), la densitat **fibril·lar (FD)**, l'àrea de la secció transversal de les fibres musculars (**FCSA**), la màxima distància de difusió de l'oxigen des de la membrana cel·lular al centre de la fibra (**MDD**), el nombre de capil·lars en contacte amb cada fibra muscular (**NCF**) i la tipologia o percentatge de cada tipus de fibra muscular (**FOG, FG, SO**), entre d'altres (pàg. 83). Per altra banda, en el vessant **BQ** es van estudiar diferents activitats **enzimàtiques** relacionades amb el metabolisme **oxidatiu** (**lactat deshidrogenasa, LDH**, i **citrat sintasa, CS**), així com la concentració de les proteïnes totals i de la **mioglobina (Mb)**. Les raons d'aquests indicadors es detallen més endavant. Finalment, en l'apartat d'hematologia els principals paràmetres analitzats, entre d'altres, foren (pàg. 91): concentració d'hemoglobina (Hb), hematòcrit (Hct) i cèl·lules sanguínies de la línia vermella (RBC) i blanca (WRC).

El programa d'exposició a **HHI** es va efectuar en una cambra **hipobàrica** que simulava una altitud de 5.000 metres. El programa va consistir en sessions diàries de 4 hores, durant 5 dies a la setmana, fins a completar un total de 22 dies d'**hipòxia hipobàrica** intermitent. Les mostres es van extreure a l'acabar els 22 dies de **HHI** (grup **Hipòxic**), 20 dies després de la finalització de l'exposició (grup **Post20_d**), 40 dies després de la finalització de l'exposició (grup **Post40_d**) i van ser comparats amb un grup Control, **estabulats** en les mateixes condicions que els grups experimentals però sense la **HHI**. Els grups **Post20_d** i **Post40_d** es van utilitzar per a observar la tendència o evolució dels possibles canvis. Els animals emprats per a l'estudi van ser rates **Sprague-Dawley** (n=58), de sexe masculí, d'una edat de 6 setmanes a l'inici de l'experiment i amb un pes inicial

mitjà de $298 \pm 27,30$ g (mitjana \pm desviació estàndard). Aquests animals es van distribuir aleatòriament en els 4 grups descrits anteriorment.

Un cop anestesiats els animals es van extreure les mostres a estudiar. En primer lloc, mitjançant la tècnica de la punció cardíaca extraïrem sang que, posteriorment seria analitzada amb el comptador de cèl·lules Celltac α . Per a l'anàlisi **HQ** utilitzarem el ventricle dret, la regió **costal** dreta del diafragma i el **TA** esquerre, mentre que el ventricle esquerre, la mateixa regió **costal** anterior del diafragma, però del seu costat esquerre i el **TA** dret, van ser utilitzats en les anàlisis **BQ**.

Les mostres per a **HQ** es van conservar en nitrogen líquid (-160°C) fins al seu posterior processament. Aquest consistia en talls transversals seriatos de les mostres d'un gruix entre $14\text{-}20\ \mu\text{m}$ (depenent del mètode) i en les posteriors **tincions**. En el cor, a causa de l'existència d'un sol tipus **metabòlic** de fibres musculars, únicament es va realitzar la **tinció** de l'**endoteli capil·lar o de capil·lars, e-ATPasa** (Fouces et al., 1993), mentre que en el **DFG** i **TA**, també es va procedir a les **tincions** de miosina ATPasa (**m-ATPasa**) a diferents **pH** de **preincubació** (Brooke & Kaiser, 1970) i a la **tinció** de **succinat deshidrogenasa, SDH** (Nachlas et al., 1957). La **tinció** d'e-ATPasa ens permet identificar els capil·lars que envolten cada fibra muscular. La **tinció** m-ATPasa distingeix les fibres de contraccions ràpides de les lentes. Finalment, el mètode **SDH** diferencia les fibres depenent del seu metabolisme: **oxidatiu** (aeròbic) o no **oxidatiu (anaeròbic)**. Amb la combinació dels mètodes m-ATPasa i **SDH** podem classificar les fibres musculars, segons el seu metabolisme, en lentes i aeròbiques (**SO, slow oxidative**), en ràpides, aeròbiques i **glucolítiques (FOG, fast oxidative glycolytic)** i en ràpides i **glucolítiques (FG, fast glycolytic)**. Una vegada les mostres van estar tenyides es va procedir a la captació i processament digital de les imatges amb un software adequat (**Sigma-Scan Pro 5** de **Jandel Scientific; Erkrath**, Alemanya). En el **MIO** es van analitzar 2 camps del ventricle dret, es van triar 3 regions de la zona dreta **costal** del **DFG** i finalment, 5 camps de la zona equatorial, regió mitjà-medial del **TA**, ja que

aquest múscul no és homogeni i té diferent composició i característiques **metabòliques** depenent de la regió (Torrella et al., 2000).

Per a l'estudi **BQ** les mostres es van conservar en un congelador a -80°C . Es van analitzar: **activitat enzimàtica** lactat deshidrogenasa, **LDH** (Beutler et al., 1977) i **activitat enzimàtica** citrat sintasa, **CS** (Srere, 1969). El **LDH** és un enzim **citosòlic glucolític** àmpliament usat com a marcador del metabolisme **anaeròbic**, mentre que el **CS** és un enzim **mitocondrial** implicat en el cicle de **Krebs** que s'utilitza com a **indicador** del metabolisme **oxidatiu**. D'altra banda, també es van determinar les **concentracions** de mioglobina, **Mb** (Reynafarje, 1963), que intervé en l'emmagatzematge i difusió **intramuscular** de l'oxigen, i la **concentració total de proteïnes** (Bradford, 1976).

RESULTATS

Els valors dels paràmetres són expressats com a mitjana \pm error estàndard. Les comparacions entre els diferents grups experimentals (Hipòxic, Post20_d, Post40_d) i el grup Control es determinaren mitjançant l'anàlisi de la variança 1 via (ANOVA). L'anàlisi i tractament estadístic de les dades es realitzà amb el software Sigma-Stat (SPSS Science, USA), considerant diferències significatives els valors de $P < 0,05$.

Al comparar el **patró de creixement** entre els grups hipòxics i el Control no es detectaren diferències significatives (Fig. 4.1, pàg. 102). Així com tampoc ni en els valors dels **pesos absoluts** ni en els **relatius** [(pes mostra/pes animal) \times 100] entre els diferents grups de les diferents mostres (Taula 4.1, pàg. 102).

En canvi, en els **paràmetres Hb, Hct, RBC i WBC** s'observaren variacions (Fig. 4.2 i 4.3 pàg. 104). En els 3 primers paràmetres detectàrem diferències significatives entre el grup Hipòxic i la resta de grups. Mentre que en el WBC l'única diferència significativa existent fou entre el grup Control i el grup Post20_d.

Seguint una tendència similar, l'exposició a HHI provocà canvis en els paràmetres de densitat capil·lar (CD: capil·lars/mm²) i de densitat fibril·lar (FD: fibres/mm²) en el **MIO**, observant-se una mateixa evolució: augment

progressiu dels valors en els grups Hipòxic i Post20_d i disminució en el grup Post40_d (Fig. 4.4, pàg. 105). En ambdós paràmetres es detectaren canvis significatius entre el grup Control i el Post20_d i a més en FD també entre el Hipòxic i el Post40_d. No es trobaren diferències significatives en CD/FD, però sí en el NCF, on es detectà un augment progressiu dels valors en els grups experimentals. Havent diferències significatives entre el grup Control (4,0±0,12) i el Post20_d (4,5±0,10) i també entre Control i Post40_d (Fig. 4.5, pàg. 106). L'índex CCA expressa la relació entre els capil·lars en contacte amb cada fibra i la secció transversal de cada fibra ($\frac{NCF \times 10^3}{FCSA}$). Aquest índex és el paràmetre que mostra les majors diferències significatives (P<0,001), amb increments dels grups hipòxics entre el 22% i el 32%, respecte al grup Control (Fig. 4.7, pàg. 108). Quant als paràmetres morfomètrics s'observa una mateixa tendència en la FCSA (Fig. 4.8, pàg. 109) i en la MDD (Fig. 4.9, pàg. 110): disminució progressiva dels valors en els grups Hipòxic i Post20_d i una recuperació en el grup Post40_d. Són estadísticament significatives les diferències entre el grup Control i els grups Hipòxic i Post20_d, per a ambdós paràmetres. Per altra banda, totes els canvis es desenvolupen sense modificar la morfologia de les fibres, Shape Factor (Taula 4.3 pàg. 112).

En el **DFG** observarem valors superiors en tots els grups hipòxics (Hipòxic, Post20_d, Post40_d) respecte al Control en els paràmetres de CD i FD, però solament son estadísticament significatius els canvis en la CD entre els grups Control i Post20_d (Fig. 4.12, pàg. 113). Similarment succeeix en els paràmetres CD/FD i NCF (Taula 4.4, pàg. 114) on no es troben modificacions estadísticament significatives, encara que en tots els grups hipòxics detectarem valors superiors respecte al Control (CD/FD: 1,94±0,05. NCF FOG: 5,39±0,393, FG: 7,31±0,514 i SO: 5,15±0,360) i en el paràmetre CD/FD fins i tot s'observa una clara distribució diferencial dels animals hipòxics respecte a les rates Control al confrontar-les en un diagrama cartesià (Fig. 4.13, pàg. 114). Quant a la FCSA (Fig. 4.15, pàg. 117) i a la MDD (Fig. 4.16, pàg. 118) les úniques variacions significatives es produïren per a ambdós paràmetres en les fibres

oxidatives lentes (SO). En l'índex CCA les diferències foren majors, observant canvis significatius en tots els tipus de fibra: SO, FOG i FG (Fig. 4.17, pàg. 119). Referent a la tipologia de fibres (% de cada tipus de fibra muscular en cada grup de rates) solament es trobaren canvis estadísticament significatius entre els grups Post20_d i Post40_d de las fibres FOG (Fig. 4.14, pàg. 115). Com també succeïa en el MIO, no hi ha canvis importants en la morfologia (Shape Factor) en cap tipus de les fibres musculars del DFG degut a la hipòxia (Taula 4.7, pàg. 121).

En el **TA** s'observen lleugers augments, no estadísticament significatius, en els paràmetres CD (Fig. 4.19, pàg. 122), FD (Fig. 4.20, pàg. 123) i NCF (Fig. 4.23, pàg. 126) en els 5 camps dels grups Hipòxic i Post20_d. En el Post40_d els valors tendeixen a normalitzar-se i s'aproximen al Control. Referent a la tipologia de fibres s'observa un lleuger augment en el percentatge de fibres oxidatives en els grups Hipòxic i Post20_d, així com un decrement dels valors en el grup Post40_d, fins arribar a valors del nivell del Control o, fins i tot en alguns camps, per sota (Fig. 4.25, pàg. 130). S'observa una resposta similar en la FCSA i en la MDD en els 5 camps analitzats i en els 3 tipus de fibres musculars: disminucions dels valors en el grup Hipòxic i una forta recuperació, amb marcat efecte rebot en el grup Post40_d, aconseguint en tots els casos valors majors al Control. Es registraren diferències significatives per a ambdós paràmetres en les fibres FOG i FG en els camps 1 i 5, al comparar el grup Hipòxic amb el Post40_d. Respecte a l'índex CCA els grups Hipòxic i Post20_d mostren un augment, mentre que els valors del grup Post40_d cauen per sota dels nivells basals del Control. Com ja s'observà en el MIO i en el DFG, en el TA tampoc existeixen modificacions en la forma (Shape Factor) de cap dels tipus de fibres musculars (Taula 4.9, pàg. 145).

Respecte als resultats **BQ** observàrem en el MIO una disminució dels valors **LDH** (Fig. 4.35, pàg. 147) i un increment de l'activitat **CS** (Fig. 4.36, pàg. 148) en els animals hipòxics, detectant solament diferències significatives entre el grup Control i Post20_d de la activitat LDH. En contraposició, en el TA es

detectaren augments en la activitat LDH (Fig. 4.35, pàg. 147) en els grups Post20_d i Post40_d, i disminucions dels valors CS en els 3 grups hipòxics, encara que aquestes alteracions no foren estadísticament significatives (Fig. 4.36, pàg. 149). No es detectaren diferències de cap tipus en aquests enzims en el DFG (Fig. 4.35, pàg. 147 i Fig. 4.36, pàg. 148). Amb les activitats d'ambdós enzims es calculà l'índex **LDH/CS**, òptim per a conèixer els ajustaments relatius entre el metabolisme anaeròbic i l'aeròbic, observant-se un decrement en el MIO, mentre que en el DFG es mantenia inalterable i en el TA es produïa un marcat increment significatiu del quocient entre el Control i el Post40_d (Fig. 4.37, pàg. 149).

Respecte a la concentració de **Mb** observarem augments progressius en tots els grups experimentals respecte al Control en el MIO. Curiosament, en els grups Hipòxic i Post20_d del DFG els valors de Mb són inferiors al Control, però en el grup Post40_d es produeix un increment del 20%. En el TA, encara que en el grup Hipòxic els valors siguin lleugerament inferiors al Control, en els grups Post20_d i Post40_d, la concentració de Mb ascendeix clarament. Solament es detectaren diferències significatives en las concentracions de Mb entre els grups Control i Post20_d del MIO (Fig. 4.39, pàg. 151).

No hi ha modificacions significativament importants en les concentracions de **proteïnes totals** en cap dels tres tipus de músculs analitzats en l'estudi (Fig. 4.40, pàg. 153).

CONCLUSIONS

Aquest programa de quatre setmanes d'exposició intermitent a hipòxia hipobàrica de quatre hores per sessió, s'ha mostrat com un estímul eficaç per induir hematopoesi a la rata, i també un grau variable d'angiogènesi en tots els músculs estudiats.

L'augment de la capil·larització (*CD*) en el miocardi de las rates exposades a HHI i la reducció en la mida de les fibres (*FCSA* i *MDD*), indiquen una millora en el flux d'oxigen cap a les mitocòndries en aquest teixit, la qual cosa queda clarament patent al considerar els índexs que avaluen conjuntament capil·laritat

i morfometria fibril·lar (*CCA*). Els canvis graduals observats indiquen que un programa de hipòxia intermitent de 4 setmanes desencadena alteracions morfofuncionals perdurables en la capil·larització del miocardi.

La HHI indueix diferències significatives en el caràcter oxidatiu del diafragma. Aquests canvis es produeixen sense alterar del percentatge dels tipus de fibres. La major capacitat oxidativa del diafragma en les rates hipòxiques es deu a un increment significatiu en la capil·larització (*CD*, *CCA*). Aquestes troballes suggereixen un millor flux d'oxigen cap a las mitocòndries en condicions d'hipòxia. Les majors diferències significatives es donen en les fibres lentes oxidatives (*SO*) al considerar paràmetres morfomètrics (*FCSA* i *MDD*). Aquestes fets semblen indicar que les alteracions morfofuncionals en el diafragma estan més determinades per las propietats contràctils de les fibres que pel seu caràcter metabòlic.

En el múscul *tibialis anterior*, encara que s'observen uns lleugers increments en els paràmetres de capil·larització (*CD* i *NCF*), juntament amb uns descensos moderats dels indicadors morfomètrics (*FCSA*, *FPER*, *MDD*), la seva activitat sedentària i l'alt percentatge de fibres ràpides (sobretot *FG*), fa que sigui poc sensible a la reducció d'oxigen. Malgrat això, s'observen unes lleugeres tendències, però essent aquestes les menys importants quantitativament de totes las mostres analitzades.

L'activitat lactat deshidrogenasa (*LDH*) mostrà un patró d'evolució diferent en cada un dels músculs analitzats al llarg del programa. Mentre que en el miocardi s'observà una tendència descendent, en el diafragma es va mantenir inalterable i en múscul *tibialis anterior* es detectà una tendència a l'augment. Aquestes diferències es relacionen clarament amb la diversitat del caràcter oxidatiu dels tres músculs estudiats, des del caràcter predominantment aeròbic del miocardi fins al marcat caràcter anaeròbic del *tibialis anterior*.

La tendència a l'alça de l'activitat *CS* en el miocardi es pot atribuir a la necessitat d'augmentar l'eficiència de metabolització de l'oxigen per a fer front als requeriments energètics.

El nostre programa d'exposició a HHI sembla reduir la dependència del metabolisme anaeròbic, augmentar l'aeròbic i incrementar la capacitat d'emmagatzematge d'oxigen i la seva capacitat de difusió en el miocardi de rata. En canvi, el fet de que no trobéssim diferències significatives en els mateixos paràmetres per al diafragma sembla indicar que, a més de la hipòxia, també és important el treball o activitat del múscul, perquè encara que el diafragma, com el cor, sempre està en funcionament, probablement la major càrrega de treball durant la hiperventilació induïda per la hipòxia fou assumida pels músculs intercostals, sense fer augmentar suficientment la càrrega global de treball d'aquest múscul.

Per altra banda, les modificacions no significatives en el valor de proteïnes totals suggereixen un canvi en el patró de síntesi proteica dels músculs estudiats i una pressió oncòtica constant.

Per últim, totes les alteracions observades es produeixen sense canviar el patró de creixement normal dels animals ni variant els pesos absoluts ni relatius de les mostres. És ben conegut que la hipòxia crònica o extrema (Howald et al., 1990; Rose et al., 1988) causa atrofia i pèrdua de massa muscular. Per aquests motius, creiem que aquest model d'aclimatació a la altitud és especialment útil i que, a més d'estimular mecanismes compensatoris per a un millor subministrament i consum d'oxigen a nivell perifèric, no provoca ni pèrdues de pes corporal ni de massa muscular.

7.2 Resum Castellà

INTRODUCCIÓN

El objetivo de este estudio es profundizar en los mecanismos básicos de aclimatación a nivel periférico inducidos por la hipoxia hipobárica intermitente (HHI). Nuestro grupo describió en humanos protocolos eficaces para la aclimatación a mediana y gran altura, así como para la mejora del rendimiento físico (Casas et al., 2000; Ricart et al., 2000; Rodríguez et al., 1999). Estos estudios fueron realizados en seres humanos, tenían un carácter no invasivo y se focalizaban básicamente en las respuestas respiratorias y cardiovasculares centrales, mediante la monitorización de parámetros ergoespirométricos y análisis hematológicos y bioquímicos plasmáticos completos (Casas et al., 2001; Rodríguez et al., 2001). Basándonos en el principio de sinmorfosis (formación de elementos estructurales orientada a satisfacer, pero no exceder, los requerimientos funcionales) formulado por Taylor y Weibel en 1981, podemos plantear la hipótesis de que estas respuestas de aclimatación a nivel central deben ir acompañadas por otras alteraciones en la vascularización y en el carácter oxidativo en territorios periféricos, especialmente en el tejido muscular. Para contrastar esta hipótesis es necesario realizar un análisis de las posibles respuestas frente a la HHI en el intercambio periférico de gases y otras posibles modificaciones a nivel celular. Para ello decidimos realizar estudios invasivos a nivel del miocardio (MIO), del diafragma (DFG) y del *tibialis anterior* (TA). Se eligieron estos músculos (MIO y DFG) debido a la importancia que tienen en la fisiología general de los animales, y sobretodo en la hipoxia, ya que en dichas condiciones aumenta su carga de trabajo, y también por la futura aplicabilidad médica y terapéutica que estas respuestas pudieran ofrecer. Por otra parte se eligió el TA como músculo esquelético con baja actividad, ya que nuestros animales estaban confinados en las jaulas con un patrón de conducta sedentario. Debido a las lógicas limitaciones, tanto técnicas como éticas, para la realización de este tipo de estudio en seres humanos, procedimos a reproducir en ratas de laboratorio protocolos de exposición a hipoxia intermitente capaces de inducir las respuestas hematológicas descritas anteriormente en humanos y,

una vez establecidos tales protocolos, dispusimos de un modelo experimental que nos permitió el estudio del efecto de HHI en el intercambio periférico de gases.

MATERIALES Y MÉTODOS

Nuestro estudio se desarrolló en una doble línea principal: la histoquímica (HQ) y la bioquímica (BQ), pero también se realizaron estudios hematológicos de soporte para comprobar que se inducían respuestas a nivel central, como sucedía en los estudios anteriores con humanos. En la HQ se analizaron parámetros como la densidad capilar (CD), la densidad fibrilar (FD), el área de la sección transversal de las fibras musculares (FCSA), la máxima distancia de difusión desde la membrana celular al centro de la fibra (MDD), el número de capilares en contacto con cada fibra muscular (NCF) y la tipología o porcentaje de cada tipo de fibra muscular (FOG, FG, SO), entre otros (pág. 83). Por otra parte, en la vertiente BQ se estudiaron diferentes actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo oxidativo (lactato deshidrogenasa, LDH, y citrato sintasa, CS), así como la concentración de las proteínas totales y de la mioglobina (Mb). Las razones de estos indicadores se detallan más adelante. Finalmente, en el apartado de hematología los principales parámetros analizados, entre otros, fueron (pág. 91): concentración de hemoglobina (Hb), hematocrito (Hct) y células sanguíneas de la línea roja (RBC) y blanca (WRC).

El programa de exposición a HHI se efectuó en una cámara hipobárica que simulaba una altitud de 5.000 metros. Consistió en sesiones diarias de 4 horas, durante 5 días a la semana, hasta completar un total de 22 días de hipoxia hipobárica intermitente. Las muestras se extrajeron al terminar los 22 días de HHI (grupo Hipóxico), 20 días después de la finalización de la exposición (grupo Post20_d), 40 días después de la finalización de la exposición (grupo Post40_d) y fueron comparados con un grupo Control, estabulado en las mismas condiciones que los grupos experimentales pero sin la HHI. Los grupos Post20_d y Post40_d se utilizaron para observar la tendencia o evolución de los posibles cambios. Los animales utilizados para el estudio fueron ratas Sprague-Dawley (n=58), de sexo masculino, de una edad de 6 semanas al inicio del

experimento y con un peso inicial medio de $298 \pm 27,30$ g (media \pm desviación estándar). Estos animales se distribuyeron aleatoriamente en los 4 grupos descritos anteriormente.

Una vez anestesiados los animales se extrajeron las muestras a estudiar. En primer lugar, mediante la técnica de la punción cardíaca se extrajo la sangre que, posteriormente sería analizada con el contador de células Celltac α . Para el análisis HQ utilizamos el ventrículo derecho, la región costal derecha del diafragma y el TA izquierdo, mientras que el ventrículo izquierdo, la misma región costal anterior del diafragma, pero de su lado izquierdo y el TA derecho, fueron utilizados en los análisis BQ.

Las muestras para **HQ** se conservaron en nitrógeno líquido (-160°C) hasta su posterior procesamiento. Este consistía en cortes transversales seriados de las muestras de un grosor entre $14\text{-}20\ \mu\text{m}$ (dependiendo del método) y en las posteriores tinciones. En el corazón debido a la existencia de un solo tipo metabólico de fibras musculares, únicamente se realizó la tinción del **endotelio capilar o de capilares, e-ATPasa** (Fouces et al., 1993), mientras que en el DFG y TA también se procedió a las tinciones de **miosina ATPasa (m-ATPasa)** a diferentes pH de preincubación (Brooke & Kaiser, 1970) y de succinato deshidrogenasa, **SDH** (Nachlas et al., 1957). La tinción de e-ATPasa nos permite identificar los capilares que rodean cada fibra muscular. La tinción m-ATPasa distingue las fibras de contracción rápidas de las lentas. Finalmente, el método SDH diferencia las fibras dependiendo de su metabolismo: oxidativo (aeróbico) o no oxidativo (anaeróbico). Con la combinación de los métodos m-ATPasa y SDH podemos clasificar las fibras musculares, según su metabolismo, en lentas y aeróbicas (SO, slow oxidative), en rápidas, aeróbicas y glucolíticas (FOG, fast oxidative glycolytic) y en rápidas y glucolíticas (FG, fast glycolytic). Una vez las muestras estuvieron teñidas se procedió a la captación y procesamiento digital de las imágenes con un software adecuado (Sigma-Scan Pro 5 de Jandel Scientific; Erkrath, Alemania). En el MIO se analizaron 2 campos del ventrículo derecho, se eligieron 3 regiones de la zona derecha costal del DFG y finalmente, 5 campos de la zona ecuatorial, región medio-

medial del TA, ya que este músculo no es homogéneo y muestra diferente composición y características metabólicas dependiendo de la región (Torrella et al., 2000).

Para el estudio **BQ** las muestras se conservaron en un congelador a -80°C . Se analizaron: actividad enzimática lactato deshidrogenasa, **LDH** (Beutler et al., 1977) y citrato sintasa, **CS** (Srere, 1969). La LDH es una enzima citosólica glucolítica ampliamente usada como marcador del metabolismo anaeróbico, mientras que la CS es una enzima mitocondrial implicada en el ciclo de Krebs que se utiliza como indicador del metabolismo oxidativo. Por otro lado, también se determinaron las **concentraciones de mioglobina (Mb)**, que interviene en el almacenamiento y difusión intramuscular del oxígeno (Reynafarje, 1963), y la **concentración total de proteínas** (Bradford, 1976).

RESULTADOS

Los valores de los parámetros vienen expresados como media \pm error estándar. Las comparaciones entre los diferentes grupos experimentales (Hipóxico, Post20_d, Post40_d) y el grupo Control se determinaron mediante el análisis de la varianza 1 vía (ANOVA). El análisis y tratamiento estadístico de los datos se realizó con el software Sigma-Stat (SPSS Science, USA), considerando diferencias significativas los valores de $P < 0,05$.

Al comparar el **patrón de crecimiento** entre los grupos hipóxicos y el Control no se detectaron diferencias significativas (Fig. 4.1, pág. 102). Así como tampoco ni en los **valores de los pesos absolutos** ni en los **relativos** [(peso muestra/peso animal) \times 100] entre los diferentes grupos de las diferentes muestras (Tabla 4.1, pág. 102).

En cambio, en los **parámetros Hb, Hct, RBC y WBC** se observaron variaciones (Fig. 4.2 i 4.3 pág. 104). En los 3 primeros parámetros detectamos diferencias significativas entre el grupo Hipóxico y los otros grupos. Mientras que en el WBC la única diferencia significativa existente fué entre el grupo Control y el grupo Post20_d.

Siguiendo una tendencia similar, la exposición a HHI provocó cambios en los parámetros de densidad capilar (CD: capilares/mm²) y de densidad fibrilar (FD: fibras/mm²) en el **MIO**, observándose una misma evolución: aumento progresivo de los valores en los grupos Hipóxico y Post20_d y disminución en el grupo Post40_d (Fig. 4.4, pág. 105). En ambos parámetros se detectaron cambios significativos entre el grupo Control y el Post20_d y además en FD también entre el Hipóxico y el Post40_d. No se encontraron diferencias significativas en CD/FD, pero si en el NCF, donde se detectó un aumento progresivo de los valores en los grupos experimentales. Habiendo diferencias significativas entre el grupo Control (4,0±0,12) y el Post20_d (4,5±0,10) y también entre Control y Post40_d (Fig. 4.5, pág. 106). El índice CCA expresa la relación entre los capilares en contacto con cada fibra y la sección transversal de cada fibra ($\frac{NCF \times 10^3}{FCSA}$). Dicho índice es el parámetro que muestra las mayores diferencias significativas (P<0,001), con incrementos de los grupos hipóxicos entre el 22% y el 32%, respecto al grupo Control (Fig. 4.7, pág. 108). En cuanto a los parámetros morfométricos se observa una misma tendencia en el FCSA (Fig. 4.8, pág. 109) y en la MDD (Fig. 4.9, pág. 110): disminución progresiva de los valores en los grupos Hipóxico y Post20_d y una recuperación en el grupo Post40_d. Son estadísticamente significativas las diferencias entre el grupo Control y los grupos Hipóxico y Post20_d, para ambos parámetros. Por otro lado, todos los cambios tienen lugar sin modificar la morfología de las fibras, Shape Factor (Tabla 4.3 pág. 112).

En el **DFG** observamos valores superiores en todos los grupos hipóxicos (Hipóxico, Post20_d, Post40_d) respecto al Control en los parámetros de CD y FD, pero solamente son estadísticamente significativos los cambios en la CD entre los grupos Control y Post20_d (Fig. 4.12, pág. 113). Similarmente sucede en los parámetros CD/FD y NCF (Tabla 4.4, pág. 114) donde no se encuentran modificaciones estadísticamente significativas, aunque en todos los grupos hipóxicos detectamos valores superiores respecto al Control (CD/FD: 1,94±0,05. NCF FOG: 5,39±0,393, FG: 7,31±0,514 i SO: 5,15±0,360) y en el

parámetro CD/FD incluso se observa una clara distribución diferencial de los animales hipóxicos respecto a las ratas Control al confrontarlos en un diagrama cartesiano (Fig. 4.13, pág. 114). En cuanto a la FCSA (Fig. 4.15, pág. 117) y a la MDD (Fig. 4.16, pág. 118) las únicas variaciones significativas se producen para ambos parámetros en las fibras oxidativas lentas (SO). En el índice CCA las diferencias fueron mayores encontrándose cambios significativos en todos los tipos de fibra: SO, FOG y FG (Fig. 4.17, pág. 119). En lo referente a la tipología de fibras (% de cada tipo de fibra muscular en cada grupo de ratas) sólo se encontraron cambios estadísticamente significativos entre los grupos Post20_d y Post40_d de las fibras FOG (Fig. 4.14, pág. 115). Como también sucedía en el MIO, no hay cambios importantes en la morfología (Shape Factor) en ningún tipo de las fibras musculares del DFG debido a la hipoxia (Tabla 4.7, pág. 121).

En el **TA** se observan ligeros aumentos, no estadísticamente significativos, en los parámetros CD (Fig. 4.19, pág. 122), FD (Fig. 4.20, pág. 123) y NCF (Fig. 4.23, pág. 126) en los 5 campos de los grupos Hipóxico y Post20_d. En el Post40_d los valores tienden a normalizarse y se aproximan al Control. En lo referente a la tipología de fibras se observa un ligero aumento en el porcentaje de fibras oxidativas en los grupos Hipóxico y Post20_d, así como un decremento de los valores en el grupo Post40_d, hasta llegar a valores del nivel del Control o, incluso en algunos campos, por debajo (Fig. 4.25, pág. 130). Se observa una respuesta similar en la FCSA y en la MDD en los 5 campos analizados y en los 3 tipos de fibras musculares: disminuciones de los valores en el grupo Hipóxico y una fuerte recuperación, con marcado efecto rebote en el grupo Post40_d, consiguiendo en todos los casos valores mayores al Control. Se registraron diferencias significativas para ambos parámetros en las fibras FOG y FG en los campos 1 y 5, al comparar el grupo Hipóxico con el Post40_d. Respecto al índice CCA los grupos Hipóxico y Post20_d muestran un aumento, mientras que los valores del grupo Post40_d caen por debajo de los niveles basales del Control. Como ya se observó en el MIO y en el DFG, en el TA tampoco existe modificación en la forma (Shape Factor) de ninguno de los tipos de fibras musculares (Taula 4.9, pág. 145).

Respecto a los resultados **BQ** observamos en el MIO una disminución de los valores **LDH** (Fig. 4.35, pág. 147) y un incremento de la actividad **CS** (Fig. 4.36, pág. 148) en los animales hipóxicos, detectando sólo diferencias significativas entre el grupo Control y Post20_d de la actividad LDH. En contraposición, en el TA se detectaron aumentos en la actividad LDH (Fig. 4.35, pág. 147) en los grupos Post20_d y Post40_d, y disminuciones en los valores CS en los 3 grupos hipóxicos, aún así dichas alteraciones no son estadísticamente significativas (Fig. 4.36, pág. 148). No se encontraron diferencias de ningún tipo en dichos enzimas en el DFG (Fig. 4.35, pág. 147 y Fig. 4.36, pág. 148). Con las actividades de ambas enzimas se calculó el índice **LDH/CS**, óptimo para conocer los ajustes relativos entre el metabolismo anaeróbico y el aeróbico, observándose un decremento en la ratio en el MIO, mientras que en el DFG se mantenía inalterable y en el TA se producía un marcado incremento significativo del cociente entre el Control y el Post40_d (Fig. 4.37, pág. 149).

Respecto a la concentración de **Mb** observamos aumentos progresivos en todos los grupos experimentales respecto al Control en el MIO. Curiosamente, en los grupos Hipóxico y Post20_d del DFG los valores de Mb son inferiores al Control, pero en el grupo Post40_d se produce un incremento del 20%. En el TA, aunque en el grupo Hipóxico los valores sean ligeramente inferiores al Control, en los grupos Post20_d y Post40_d, la concentración de Mb aumenta claramente. Sólo se detectaron diferencias significativas en las concentraciones de Mb entre los grupos Control y Post20_d del MIO (Fig. 4.39, pág. 151).

No hay modificaciones significativamente importantes en las concentraciones de **proteínas totales** en ninguno de los tres tipos de músculos analizados en el estudio (Fig. 4.40, pág. 153).

CONCLUSIONES

Este programa de cuatro semanas de exposición intermitente a hipoxia hipobárica de cuatro horas por sesión, se ha mostrado como un estímulo eficaz para inducir hematopoiesis en la rata, y también un grado variable de angiogénesis en todos los músculos estudiados.

El aumento de la capilarización (*CD*) en el miocardio de las ratas expuestas a HHI y la reducción en el tamaño de las fibras (*FCSA* y *MDD*), indican una mejora en el flujo de oxígeno hacia las mitocondrias en este tejido, lo cual queda claramente patente al considerar los índices que evalúan conjuntamente capilaridad y morfometría fibrilar (*CCA*). Los cambios graduales observados indican que un programa de hipoxia intermitente de 4 semanas desencadena alteraciones morfofuncionales perdurables en la capilarización del miocardio.

La HHI induce diferencias significativas en el carácter oxidativo del diafragma. Estos cambios se producen sin alteración del porcentaje de los tipos de fibras. La mayor capacidad oxidativa del diafragma en las ratas hipóxicas se debe a un incremento significativo en capilarización (*CD*, *CCA*). Estos hallazgos sugieren un mejor flujo de oxígeno hacia las mitocondrias en condiciones de hipoxia. Las mayores diferencias significativas se producen en las fibras lentas oxidativas (*SO*) al considerar parámetros morfométricos (*FCSA* y *MDD*). Estos hechos parecen indicar que las alteraciones morfofuncionales en el diafragma están más determinadas por las propiedades contráctiles de las fibras que por su carácter metabólico.

En el músculo *tibialis anterior*, a pesar de que se observan unos ligeros incrementos en los parámetros de capilarización (*CD* y *NCF*), juntamente con unos descensos moderados de los indicadores morfométricos (*FCSA*, *FPER*, *MDD*), su actividad sedentaria y el alto porcentaje de fibras rápidas (sobre todo *FG*), hace que sea poco sensible a la reducción de oxígeno. Aun así, se observan unas ligeras tendencias, pero siendo estas las menos importantes cuantitativamente de todas las muestras analizadas.

La actividad lactato deshidrogenasa (*LDH*) mostró un patrón de evolución diferente en cada uno de los músculos analizados a lo largo del programa. Mientras que en el miocardio se observó una tendencia descendente, en el diafragma se mantuvo inalterable y en músculo *tibialis anterior* se detectó una tendencia al aumento. Estas diferencias se relacionan claramente con la diversidad del carácter oxidativo de los tres músculos estudiados, desde el carácter predominantemente aeróbico del miocardio hasta el marcado carácter anaeróbico del *tibialis anterior*. La tendencia a la alza de la actividad *CS* en el miocardio se puede atribuir a la necesidad de aumentar la eficiencia del metabolismo aeróbico para hacer frente a los requerimientos energéticos.

Nuestro programa de exposición a HHI parece reducir la dependencia del metabolismo anaeróbico, aumentar el aeróbico e incrementar la capacidad de almacenaje de oxígeno y su capacidad de difusión en el miocardio de rata. En cambio, el hecho de que no encontremos diferencias significativas en los mismos parámetros para el diafragma parece indicar que, además de la hipoxia, también es importante el trabajo o actividad del músculo, porque aunque el diafragma, como el corazón, siempre está en funcionamiento, probablemente la mayor carga de trabajo durante la hiperventilación inducida por la hipoxia fue asumida por los músculos intercostales, sin así hacer aumentar suficientemente la carga global de trabajo de dicho músculo.

Por otra parte, las modificaciones no significativas en el valor de proteínas totales sugieren un cambio en el patrón de síntesis proteica de los músculos estudiados y una presión oncótica constante.

Por último, todas las alteraciones observadas se producen sin cambiar el patrón de crecimiento normal de los animales ni variando los pesos absolutos ni relativos de las muestras. Es bien conocido que la hipoxia crónica o extrema (Howald et al., 1990; Rose et al., 1988) causa atrofia y pérdida de masa muscular. Por estos motivos, creemos que este modelo de aclimatación a la altitud es especialmente útil ya que, además de estimular mecanismos compensatorios para una mejor entrega y consumo de oxígeno a nivel periférico, no provoca ni pérdidas de peso corporal ni de la masa muscular.