



**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

## **5 DISCUSSIÓ**

---

*“Ciència és tot allò sobre el que  
sempre es pot discutir”.*

*José Ortega i Gasset, filòsof espanyol  
de gran influència del segle XX.*



## 5.1 VISIÓ GENERAL

Com ja hem vist en l'apartat 1.8 "*Interès de l'estudi*" pàg. 42, els estudis previs en humans realitzats pel nostre grup detectaren canvis fisiològics deguts a la hipòxia hipobàrica intermitent i establiren un protocol vàlid per a l'aclimatació a mitjana i gran altura (Casas et al., 2000; Ricart et al., 2000) i per a la millora del rendiment físic (Rodríguez et al., 1999). Aquests primers 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).

La hipòxia és una situació d'estrès ambiental en la qual l'organisme és capaç de respondre, per mantenir el nivell del metabolisme aeròbic en condicions de reducció de la disponibilitat d'O<sub>2</sub> en l'atmosfera. D'acord amb el principi de simmorfoosi (formació d'elements estructurals orientada a complaure, però sense excedir-se, els requeriments funcionals) formulada per Taylor i Weibel (1981), cal esperar que les respostes adaptatives detectades i descrites en humans a nivell central (control respiratori i cardíac) i hematològic vagin acompanyades d'alguns ajustaments harmònics a nivell perifèric. Per tal d'augmentar els coneixements sobre aquestes possibles respostes en l'intercanvi perifèric i els possibles canvis produïts a nivell cel·lular, s'optà per fer estudis de caràcter invasiu. Per qüestions ètiques i tècniques òbvies, aquests estudis no es podien efectuar amb humans, pel que es va resoldre portar-los a terme amb animals d'experimentació. Decidírem utilitzar animals murins degut al fet de ser un bon model experimental ja que, la distribució i tipologia de les fibres musculars junt amb les activitats enzimàtiques en rates, són comparables als humans (Abdelmaki et al., 1996). A més, els canvis en el temps d'aquests animals són semblants als humans (Desplanches et al., 1996). En primer lloc va ser necessari establir els models de programa d'exposició intermitent a hipòxia hipobàrica que induïen en les rates uns canvis hematològics iguals als detectats en humans. Solament després de realitzar una gran quantitat de dissenys

experimentals i quan el protocol d'exposició en animals quedà ben establert, s'iniciaren aquests estudis.

L'estudi dels efectes de la hipòxia, tant a nivell de laboratori com en la natura, sempre ha estat complicat, com podem apreciar en la gran diversitat de resultats obtinguts en els diferents estudis, alguns d'ells, fins i tot, aparentment contradictoris. Aquesta variabilitat pot dependre de diferents motius. En primer lloc el tipus d'hipòxia: aguda, intermitent o crònica. També és de vital importància el temps d'exposició a aquesta baixa  $pO_2$ , ja sigui per la durada de les sessions (en cas d'hipòxia intermitent) o per la durada total de la hipòxia (en aguda o crònica). Al laboratori pot dependre de com es produeix la hipòxia: si és normobàrica o hipobàrica, a nivell sistèmic (com a les cambres) o solament per inhalació de gas (amb mascareta). I evidentment, la intensitat de la hipòxia, és a dir, l'altura real o simulada o la  $pO_2$  que s'assoleix. Per exemple, una hipòxia crònica-intermitent suau fa disminuir l'activitat enzimàtica del cicle de Krebs, en canvi, una hipòxia crònica-intermitent severa, produeix un augment de l'activitat d'aquests enzims (Clanton & Klawitter, 2001).

Per altra banda, en l'estudi a nivell "natural" se sumen altres factors que en la majoria dels casos no es poden controlar: condicions climatològiques extremes (temperatures molt baixes, humitat, fort vent, neu, alta intensitat dels raigs solars UV), alts requeriments energètics junt amb una mala nutrició, deshidratació, descans inadequat, cansament físic, augment de catecolamines provocades per la hipòxia crònica i que augmenten la producció de radicals lliures, entre d'altres (Askew, 2002). Per la qual cosa, és difícil demostrar si els possibles canvis produïts en la natura són deguts únicament a la hipòxia o si depenen o estan influenciats, de quina manera i amb quin grau, per altres paràmetres ambientals (Hoppeler & Vogt, 2001). És generalment acceptat que en condicions d'hipòxia sistèmica crònica, tant sigui a gran altura o imposada experimentalment per cambres hipobàriques o hipòxiques, s'indueixen aclimatacions fisiològiques que ajuden a atenuar la falta de transport d' $O_2$  cap als teixits (Deveci et al., 2002). Feia falta comprovar si en condicions d'hipòxia hipobàrica intermitent també es podrien desencadenar aquestes respostes d'aclimatació, d'altres de diferents o bé d'inexistents, ja que els efectes d'aquest

tipus d'hipòxia no estan tan ben establerts i són molts menys els estudis realitzats (Aproximadament 10 cops menys, segons dades de Pubmed, <http://www.pubmed.gov>).

D'altra banda, trobem analogies entre els animals adaptats a les grans altituds i els mamífers marins en situacions d'hipòxia degudes a l'apnea, en termes de possibles adaptacions en els músculs esquelètics per mantenir el metabolisme aeròbic sota condicions hipòxiques (Hochachka, 1986; Kanatous et al., 1999). Així com també, està relacionada l'aclimatació a l'altitud amb l'exercici físic, ja que un dels factors que provoca les modificacions en l'esport és la hipòxia local (Reynafarje & Velasquez, 1966). Per la qual cosa alguns dels resultats obtinguts en hipòxia són equiparables, en certs aspectes, als mamífers bussejadors i a l'exercici físic practicat regularment.

## **5.2 PESOS DELS ANIMALS**

A l'inici dels estudis hipòxics, l'opinió generalitzada era que la hipòxia crònica podia provocar efectes positius en la capil·laritat i l'augment de la capacitat oxidativa del múscul. Després es va establir que la hipòxia severa mantinguda tenia efectes nocius sobre la musculatura, com per exemple la hipertròfia del ventricle dret, l'alteració del metabolisme proteic i l'anorèxia, que fa disminuir el pes degut a una pèrdua de massa muscular. Tots aquestes efectes colaterals es troben àmpliament descrits en nombrosa bibliografia (Rose et al., 1988; Howald et al., 1990; Hoppeler et al., 1992; Singh & Selvamurthy, 1993; Pissarek et al., 1997; Raff et al., 1999; Rumsey et al., 1999; Daneshrad et al., 2000; Deveci et al., 2001; Tschop & Morrison, 2001; Rossignol et al., 2003; Morel et al., 2005).

Al comparar els pesos absoluts dels animals experimentals no hem trobat variacions importants en el patró de creixement dels diferents grups, fins i tot els animals hipòxics han tingut un pes lleugerament superior als Control. Aquests resultats concorden amb els descrits per Kayar i Banchemo (1985), Deveci i col·laboradors (2002) i Deindl i col·laboradors (2003). En altres estudis o aclimatacions similars, en quant a grau d'hipòxia (altura) i durada, però amb exposicions cròniques, sí que ha hagut una disminució de la ingesta i del pes

corporal (Snyder et al., 1985; Singh & Selvamurthy, 1993). Aquest decrement també es va donar en altres estudis amb un protocol d'hipòxia hipobàrica intermitent (Morel et al., 2005).

Similarment, tampoc hem trobat canvis estadísticament significatius ni en els pesos absoluts de les mostres ni en els pesos relatius d'aquestes, és a dir, que no s'ha donat ni hipertròfia ventricular ni atròfia de la musculatura esquelètica, essent aquests valors dels pesos molt similars en tots els animals emprats per a l'estudi, tot i que en experiments crònics s'ha detectat un increment del pes del cor degut sobretot a una hipertròfia del ventricle dret (Banchemo et al., 1987).

Per aquests motius, aquest protocol d'exposició a hipòxia hipobàrica intermitent podria ser considerat com un bon mètode d'aclimatació en aquest sentit, ja que no s'han detectat alteracions en els pesos dels animals ni de les mostres analitzades, ni hipertròfia del cor ni atròfia dels músculs esquelètics estudiats.

## **5.3 HISTOQUÍMICA**

### **5.3.1 Miocardi**

Valdivia (1958) fou el primer en descriure l'augment de la capil·larització amb l'altitud, en trobar un augment de capil·lars per àrea, CD, o per C/F. Des d'aleshores s'han portat a terme a nivell cardíac nombrosos estudis en diferents espècies d'animals i en varies etapes de la seva vida. Els resultats obtinguts en la majoria dels casos no són del tot concloents com veurem a continuació. En el cor d'ovins fetals i de les seves mares es va apreciar que després de 109 dies a 3.820 metres no es produïren aclimatacions morfològiques en el miocardi. Els fetus tingueren un creixement normal i els paràmetres estudiats (CD, FCSA, NCF i pes dels ventricles) no variaren significativament entre el grup Control i l'Hipòxic, tant per als fetus com per a les mares (Lewis et al., 1999). Similarment, es feu l'estudi en rates nounades i amb les seves progenitores. Tots els animals restaren durant 2 setmanes a una altitud simulada de 5.000 metres a partir de la setmana posterior del naixement. Respecte als adults,

l'únic canvi observat fou la hipertròfia del ventricle dret. En altres paràmetres, com la CD, FCSA o C/F, els resultats no presentaren alteracions (Pietschman & Bartels, 1985). En altres animals com els conills d'Índia exposats durant 4 ó 14 setmanes a 4.500 metres es detectaren a nivell del miocardi un augment de la CD i de C/F, així com una reducció de la distància de difusió (Kayar & Banchemo, 1985). També s'han confrontat les mateixes espècies animals però amb nínxols ecològics situats a diferents altures. Així doncs, s'han comparat fotxes natives a gran altura amb les del nivell del mar i s'ha observat un augment de la CD i una disminució de FCSA en els animals de més altitud (León-Velarde et al., 1993).

En rates Wistar exposades a 5.250 metres durant 34 dies s'aprecià en els animals hipòxics i en el ventricle dret un augment de la FCSA i una reducció de la CD, sense canviar el NCF (Clark & Smith, 1978). En canvi, amb un protocol d'exposició molt similar (6.000 metres durant 36 dies) amb rates Sprague-Dawley els resultats foren molt diferents, produint-se un augment de la CD en el ventricle dret (Snyder et al., 1985). Tot i aquest increment aquest autor arribà a la conclusió que la hipòxia per sí sola no provoca angiogènesi en les fibres ja existents, necessitant altres factors per a que es produeixi la neoformació dels capil·lars. On sí concordaren els resultats fou en el ventricle esquerre, on no hi hagueren alteracions ni a nivell de capil·larització ni en la mida de les fibres.

Als ventricles drets del present estudi detectàrem un increment progressiu i significatiu dels valors de CD i FD, en els grups Hipòxic i Post20<sub>d</sub>. L'augment dels capil·lars és beneficiós per a la irrigació de la musculatura i dels òrgans, ja que asseguren un millor subministrament d'O<sub>2</sub> als teixits. Aquests increments es podrien associar a les disminucions significatives de FCSA, FPER i MDD, ja que al disminuir la mida de les fibres musculars tindríem més capil·lars i fibres per unitat de superfície sense que hi hagués angiogènesi, tal i com va hipotetitzar Hepple (2000), tot i que en el seus estudis no hi havia canvis en el NCF. Aquest no és el nostre cas, ja que el paràmetre de NCF augmenta progressivament en tots els grups hipòxics, a diferència dels altres paràmetres on els valors del grup Post40<sub>d</sub> tendeixen a tornar als valors basals. Per la qual cosa podem afirmar



amb certa seguretat que hi ha formació de nous capil·lars sanguinis. Si relacionem la capil·larització de cada fibra (NCF) amb l'àrea de la secció transversal de les fibres (FCSA) o amb el perímetre d'aquestes (FPER). Tenim més èmfasi als resultats descrits, doncs a l'unir dos paràmetres, que ja de per sí donen diferències significatives, el que obtenim és una major potència d'anàlisi. En ambdós índexs (CCA i CCP, respectivament) detectem grans diferències significatives entre el grup Control i els grups hipòxics, el que recolza la nostra hipòtesi sobre l'angiogènesi.

Si ens centrem en la morfologia de la fibra (Shape Factor) observarem que els canvis produïts no provoquen alteracions remarcables en la forma de la secció transversal de la fibra. Les fibres al disminuir la seva àrea i perímetre transversals tendeixen a ser lleugerament més arrodonides, però sense que la modificació sigui significativa. En altres estudis realitzats amb aus, on les fibres musculars són considerablement majors, s'ha observat una elongació en la secció transversal de les fibres com a resposta adaptativa enfront la necessitat de major disponibilitat d'O<sub>2</sub> (Torrella et al., 1998). Aquesta estratègia podria donar-se per tal d'incrementar la proporció de mitocondries en posició subsarcolemal, ja que és en aquesta zona per on es distribueixen aquests orgànuls per tal de d'aprofitar més ràpidament l'O<sub>2</sub> disponible (Hoppeler et al., 1984). En el nostre estudi una possible explicació al manteniment de la morfologia de la secció transversal seria la petita mida de les fibres del miocardi i la major àrea que ocupen els capil·lars per unitat de superfície de fibra muscular (CCA). Amb aquestes característiques l'O<sub>2</sub> arriba ràpida i eficaçment a totes les mitocondries en la posició subsarcolemal.

També podem apreciar una clara separació dels diferents grups quan relacionem les CD i les FD en una representació cartesiana, observant unes coordenades similars en els grups Hipòxic i Post20<sub>d</sub>, i separats del Control i Post40<sub>d</sub> (Fig. 4.6). Els grups Control, Hipòxic i Post20<sub>d</sub> tenen una relació lineal i d'igual augment d'ambdues densitats (CD i FD). Incrementen per igual el nombre de capil·lars, així com les disminucions de les FCSA. Aquesta troballa pot justificar-se considerant la teoria de simmorfosis (Taylor & Weibel, 1981), la qual indica que l'organisme tendeix a una reestructuració equilibrada per

adaptar-se a les noves situacions, però sense excedir dels requeriments necessaris. Per la qual cosa, podem pensar que existeix una relació física-fisiològica entre la CD i la FD per tal de no sobrepassar les necessitats, però sense quedar-se curts. En canvi, el grup Post40<sub>d</sub>, al cap de cert temps de deixar de rebre l'estímul hipòxic tendeix a tornar a la situació inicial del grup Control, però ho fa lentament i de manera desigual. Mentre que la CD encara es manté bastant alta, equiparable a l'Hipòxic i Post20<sub>d</sub>, la FD ha reulat fins a nivells pròxims al Control. Aquest fet sembla indicar que en el procés de la capil·larització o angiogènesi, es posen en marxa mecanismes de nova síntesi, el procés és costós, empra un període més llarg per a que els canvis siguin visibles, però en canvi perduren més en el temps. Per altra banda, la disminució de la mida de les fibres sembla un procés més transitori possiblement perquè deu posar en marxa menys mecanismes, és energèticament menys costosa i per la qual cosa, les modificacions s'observen abans, però en canvi, també duren menys temps i tornen als seus valors basals amb més rapidesa.

Aquest fet sembla concordar amb molts dels estudis que fem referència, els quals no detectaven canvis en la capil·larització, però sí en la mida de les fibres, i pot contribuir a explicar el perquè dels seus resultats: molts d'ells mostregen just després del període d'hipòxia i no deixen temps suficient per a que determinats canvis o aclimatacions puguin ser detectats, ja que potser s'han posat en marxa diferents mecanismes compensatoris però encara no s'han desenvolupat completament.

En les distribucions dels grups depenent dels rangs de FCSA i en les corbes acumulatives d'aquests mateixos valors, s'observa que els grups d'estudi s'agrupen en 2 subconjunts, havent-hi una clara diferència en quant a disposició. D'aquesta manera s'aprecia per una banda els grups Hipòxic i Post20<sub>d</sub> i per l'altra el Control i el Post40<sub>d</sub>. Aquest fet, junt amb tots els altres resultats obtinguts, indueix a pensar que el grup Post40<sub>d</sub> té unes característiques histoquímiques més semblants al Control que no pas als altres grups hipòxics, tot i haver estat també exposat a la hipòxia hipobàrica intermitent. La qual cosa sembla indicar que l'efecte de la hipòxia té una

limitació temporal i després d'un període de recuperació, més o menys llarg, depenent del paràmetre, torna als nivells inicials.

### 5.3.2 Diafragma

La classificació dels músculs respiratoris es basa en la seva funció predominant durant el cicle ventilatori. La inspiració és la fase activa del cicle respiratori i depèn dels canvis de pressió generats per la contracció muscular. Els principals músculs inspiratoris són el DFG i els intercostals. L'expiració, en subjectes sans i en situació de repòs, és un procés passiu. Així doncs, la funció del diafragma es genera els gradients de pressió entre la superfície dels alvèols i la sang per tal que es produeixi l'intercanvi gasós. A pesar de la seva tasca tan específica, la qual no el permet descansar en tota la vida, els músculs respiratoris tenen la mateixa estructura i funcionalitat que la musculatura de les extremitats o de la resta del cos (Polla et al., 2004).

Malgrat aquesta similitud amb els altres músculs es poden distingir diferents regions depenent de l'espècie animal i de la funcionalitat i localització en el DFG. Zobundzija i col·laboradors (1998) distingia clarament la part costal de la lumbar en els diafragmes d'anyells en quant a activitats enzimàtiques (LDH, SDH, ATPasa) i mida de les fibres. En l'estudi de la tipologia de les fibres es va trobar una distribució homogènia en la distribució d'aquestes entre les regions costal i crural de DFG de rates, però diferent flux sanguini entre dites regions (Sexton & Poole, 1995). També De Troyer i col·laboradors (1988) i Reid i col·laboradors (1992) trobaven diferències significatives respecte les densitats capil·lars (CD) i àrea de les fibres (FCSA) entre la regió costal i la crural dels diafragmes canins. En canvi, Sieck i col·laboradors (1987) no detectaven diferències zonals entre la part costal i la crural en els DFG de gat, però sí entre l'abdominal i la toràcica. Deveci i col·laboradors (2002) també afirmaven que el diafragma de les rates té una composició homogènia. Per altra banda, Cobb i col·laboradors (1994) anaven més enllà i detallaven en els seus estudis que els DFG de cavall són completament diferents, en quant a morfologia i composició, a la resta de mamífers. Així doncs, degut a les diferències existents entre les

diferents regions es va delimitar molt bé la zona d'estudi, que en aquest cas seria la regió costal, que per altra banda és la més important respecte a la superfície i pes i és la que més treballa en condicions d'exercici. La majoria dels estudis realitzats en DFG corresponen a aquesta regió costal (Sexton & Poole, 1995).

En considerables estudis s'ha observat la plasticitat i capacitat d'aclimatació o de canvi en l'estructura i en la funcionalitat del DFG vers determinades situacions internes (creixement, maduració, obesitat) o externes (hipòxia, microgravetat, entrenament físic, agents farmacològics) tal i com han recollit Polla i col·laboradors (2004). Per la qual cosa es pensà en la possibilitat de canvis en l'aclimatació del DFG en condicions d'escassetat o baixa pressió d'O<sub>2</sub> per tal de preservar l'oxigenació del teixit.

Per exemple, Hansen i col·laboradors (2004) experimentaren en condicions de microgravetat durant 14 dies observant un lleuger increment no significatiu de la FCSA en tots els tipus de fibres de les rates experimentals.

Diferents estudis investigaren l'efecte de la hipòxia combinat amb l'entrenament. Bigard i col·laboradors (1992) sotmeteren els animals experimentals a un protocol d'entrenament de resistència física en unes condicions simulades de 4.000 m. Els resultats obtinguts més destacables foren un increment de la CD, mentre que la FCSA i el C/F no mostraren modificacions. En altres estudis només amb exercici físic, sense condicions de baixa pO<sub>2</sub>, es detectaren uns resultats similars als anteriors: augment de la CD, absència de canvis en C/F i petita disminució de FCSA (Powers et al., 1996). En canvi, també s'han descrit estudis on l'efecte sumatori de la hipòxia i l'exercici produeix modificacions (Suzuki, 2002).

Estudis en hipòxia crònica durant 60 dies no observaren canvis remarcables en el percentatge de les tipologies de fibra. En canvi, després de 9 mesos d'exposició crònica es detectaren disminucions del percentatge de fibres lentes cap a les ràpides. D'altra banda, estudis durant 5 setmanes a una altitud simulada de 6.000 metres no detectaren canvis en C/F, però sí un increment de la CD atribuïda a la disminució de la distància de difusió de les fibres. Aquest

augment és atribuït a canvis en la demanda de ventilació en resposta a les baixes pressions d'O<sub>2</sub>, o a la pèrdua selectiva de fibres grans, però sense defensar que es produeixi angiogènesi (Snyder et al., 1985). Contràriament, Deveci i col·laboradors (2001) afirmaren que en unes condicions similars d'altitud i durada de l'exposició crònica es produeix nova formació de capil·lars, ja que detecten un augment de la CD i del C/F, sense canviar la mida de les fibres. De manera similar en el present estudi s'observen uns resultats d'augment significatiu de les CD en els animals experimentals i uns clars increments de la FD, però no essent significatius per ben poc. Aquests canvis es produeixen sense variar considerablement el ràtio C/F, encara que estiguin clarament separats en les distribucions en l'espai (Fig. 4.13). En les representacions cartesianes de C/F hem pogut apreciar l'agrupament dels 3 grups hipòxics (Hipòxic, Post20<sub>d</sub> i Post40<sub>d</sub>) respecte al Control, degut a que els primers tenen un major nombre tant de capil·lars com de fibres musculars.

Avui en dia es coneixen bé els mecanismes moleculars subjacents a l'exposició a la hipòxia, destaca pel seu paper clau l'expressió del factor induïble per hipòxia (HIF-1 $\alpha$ ). El HIF-1 $\alpha$  és una molècula dimèrica que juga un paper crucial dins del programa d'expressió gènica que regula l'homeòstasi de l'oxigen (Semenza, 2003). Aquest factor s'expressa en tots els teixits de forma constitutiva. Quan la tensió d'oxigen a nivell subcel·lular es manté dins del rang de normalitat, HIF-1 resulta degradat per hidroxil·lació i la seva ulterior unió al complex von Hipen-Lindau (VHL) que, al seu torn, forma part d'una associació molecular complexa en la que hi participa un enzim capaç de conjuguar la ubiquitina (Ub), que és en últim terme la responsable de convertir a HIF-1 en una molècula degradable. Per contra, en absència d'oxigen, la prolilhidroxil·lase no és capaç d'hidrolitzar la molècula de HIF-1, pel que aquesta, en resposta a l'estrès hipòxic, s'acumula en el citoplasma, penetra en el nucli cel·lular i s'uneix específicament a determinats elements de l'ADN cel·lular (Harris, 2002). El factor HIF-1 actua doncs com un factor de transcripció responsable d'un programa genètic coordinat (Semenza, 2003), intervenint en funcions diverses però relacionades estretament com: alteració del patró ventilatori, increment d'eritropoesi, augment de la glucòlisi i intensificació de l'angiogènesi. Aquestes

respostes fisiològiques estan intervingudes per proteïnes específiques, la taxa de transcripció de les quals, està fortament incrementada per la presència de HIF-1, especialment els gens de la tirosina hidroxil·lase (Millhorn et al., 1997), eritopoetina (Bunn & Poyton, 1996; Bunn et al., 1998), diversos enzims glucolítics (Jiang et al., 1996; Semenza et al., 1996) i el factor angiogènic endotelial, vascular endothelial growth factor: VEGF (Levy et al., 1995).

Respecte al nombre de capil·lars en contacte amb cada fibra (NCF) els valors mostren una lleugera tendència a l'alça en els animals exposats al protocol d'hipòxia hipobàrica intermitent. Quant als paràmetres morfomètrics (FCSA, FPER i MDD) observem tendències idèntiques en tots els grups experimentals respecte al Control: davallades dels valors que indiquen que la mida de les fibres disminueix. Els únics canvis estadísticament significatius es produeixen en les fibres lentes (SO). Si relacionem els paràmetres NCF, FCSA i FPER amb tots dos índexs (CCA i CCP) detectem unes modificacions majors, al potenciar l'efecte sumatori de dos paràmetres que clarament evolucionen en sentits oposats, però en una mateixa direcció fisiològica: augmentar o facilitar el subministrament d'O<sub>2</sub> a les cèl·lules. És a dir, petits augments de NCF i lleugeres disminucions de FCSA i FPER, fan que els capil·lars de les fibres musculars hipòxiques tinguin menys superfície per actuar, i per tant, augmentin la descàrrega d'O<sub>2</sub> per unitat de superfície. Tot i fer la mateixa aportació, tenen menys superfície d'acció i per tant millora l'eficiència de subministrament d'O<sub>2</sub>.

Com hem vist en els paràmetres i índexs anteriors, les majors diferències (i sovint les úniques significatives) es produïen en les fibres oxidatives lentes (SO). Aquest fet ens guia a pensar que no només és important la càrrega hipòxica o el tipus de metabolisme de les cèl·lules, sinó també les seves propietats contràctils o de treball. Les fibres SO són les que funcionen constantment per tal de que es produeixi la inspiració. Les fibres ràpides (FOG i FG) s'activen majoritàriament en condicions d'inspiracions forçades i extremes, fet que pot ser no es dona amb profunditat en hipòxia en repòs. Observem que el DFG té un percentatge de fibres oxidatives molt elevat (al voltant del 80%) però al fer la correcció amb la mida de les fibres, aquest percentatge disminueix

dràsticament fins al 55%. Fet que ens indica que podríem considerar el DFG un múscul amb un caràcter mixt: meitat oxidatiu, meitat anaeròbic.

A excepció de les fibres FOG en els grups Post20<sub>d</sub> i Post40<sub>d</sub>, no detectem diferències importants en els percentatges de cada tipus de fibra. Al fer les correccions dels percentatges esmentats, respecte la mida de cada tipus de muscular, així com a l'agrupar-les per propietats contràctils o oxidatives, tampoc s'han detectat modificacions remarcables (Taula 4.6 pàg. 119). Fent-nos indicar tots aquests resultats que es mantenen constants els percentatges de cada tipus de fibra, la superfície ocupada per cada tipus de fibra així com les propietats contràctils i aeròbiques.

Tots els canvis es produeixen sense alterar la morfologia de les fibres musculars, encara que com les fibres es tornen lleugerament més petites, la secció de les cèl·lules també es fa més arrodonides.

Alguns autors defensen que els possibles canvis existents en els músculs respiratoris en determinades situacions i protocols d'hipòxia són atribuïts més a l'efecte mecànic que no pas a l'efecte metabòlic o ambiental. Malgrat que el DFG no augmenta el seu treball per cada respiració individual amb la hipòxia crònica (Van Liere & Stickney, 1964), la freqüència respiratòria augmenta entre un 20% i un 30%, i per tant el treball per unitat de temps augmenta (Thomas & Marshall, 1997). Independentment de com es produeixen els canvis, l'important és que els canvis hi són, ja siguin de manera directa, degut a la baixa pO<sub>2</sub>, o de manera indirecta, perquè la hipòxia provoca l'augment de la freqüència respiratòria.

### **5.3.3 Tibialis anterior**

La capillarització del múscul esquelètic motor, així com de qualsevol altre teixit, és important pel subministre d'O<sub>2</sub> i substrats cap a les cèl·lules. Està ben documentat que el nombre de capil·lars es veu alterat per l'aclimatació a l'increment o decrement de l'activitat muscular (Messonnier et al., 2001). El nombre de capil·lars també es veu alterat per l'exercici en el múscul cardíac i

esquelètic (Bigard et al., 1991). Contràriament, la disminució de l'activitat muscular, com l'ambient en microgravetat que es dona en els vols espacials i en el fet d'estar confinat en un llit, indueix una ràpida atròfia muscular i canvis microvasculars, especialment en situacions d'antigravetat (Desplanches, 1997), però en canvi, provoca un augment no significatiu de FCSA en tots els tipus de fibres (Hansen et al., 2004).

Com ja hem descrit anteriorment en el MIO i en el DFG, en la musculatura esquelètica motora trobem també una bibliografia considerable de comparacions de les mateixes espècies animals, però amb hàbitats o nínxols ecològics a diferents altures. León-Velarde i col·laboradors (1993) van comparar fotxes que habitaven a 4.200 metres amb d'altres a nivell del mar. Els resultats obtinguts foren increments en el TA, *soleus* i *plantaris* de la CD, NCF i C/F i una disminució de FCSA en els animals habitants en regions de més altura. Uns resultats semblants també foren observats per Eby i Banchemo (1976) en mamífers, concretament en gossos, detectant uns valors de CD tres cops superiors i una disminució a la meitat dels diàmetres de difusió en els animals que habitaven en les altures (4.350 m) respecte als del nivell del mar. En canvi, en altres estudis amb rates exposades a 5.500 metres amb hipòxia crònica durant 8 setmanes, amb sessions d'entrenament prèvies, no observaren canvis en la CD ni en *soleus* ni en EDL (*Extensor digitorum longus*), malgrat que la FCSA es reduí considerablement (Luedeke et al., 2004). Finalment, al comparar embrions d'ànec exposats a l'altura amb els del nivell del mar observaren un augment de la CD i disminució de FCSA en els primers (Snyder et al., 1984).

També es disposa de dades en humans, encara que de pocs estudis, degut a la necessitat d'obtenir biòpsies. Els humans adaptats a les altures tenen diferent percentatge dels tipus de fibres que no es modifica degut a l'exercici, tot i que aquest pot fer augmentar les CD i C/F, sense canviar la FCSA, tant en els humans adaptats a baixes pressions com els del nivell del mar (Desplanches et al., 1996).

En situacions d'hipòxia combinades amb exercici també observem resultats contradictoris. Desplanches i col·laboradors (1993) detectaren un increment de



FCSA, la qual cosa provoca una disminució de la FD i, per tant, un increment de C/F. En canvi, en altres estudis similars observaren un decrement de l'índex C/F (Abdelmalki et al., 1996).

S'observa una lleugera evolució o tendència d'augment en els grups Hipòxic i Post20<sub>d</sub> dels paràmetres de capil·larització (CD, NCF, CCA i CCP) i de la FD, tot i que aquests canvis no són estadísticament significatius, en la gran majoria dels casos. En altres estudis amb protocols de característiques similars, en quant a durada i intensitat de la hipòxia, tampoc detectaren cap canvi significatiu en la musculatura esquelètica analitzada, però sí una tendència similar a la que hem observat en aquest estudi (Bender et al., 1984; Snyder et al., 1985; Yamashita et al., 1994). Hem d'assenyalar però, que en d'altres estudis amb protocols més llargs i amb més "dosi hipòxica" (altura) es detectaren canvis estadísticament significatius en els músculs esquelètics *gracilis* i *plantaris* (Cassin et al., 1971).

En els paràmetres morfològics (FCSA, FPER i MDD) el TA mostra en general una mateixa tendència en totes les regions: disminucions en el grup Hipòxic i uns valors clarament per sobre del Control en el grup Post40<sub>d</sub>, indicant un clar efecte rebot. Una possible explicació per a aquest fenomen pot ser que es provoqui per dificultar la penetració d'O<sub>2</sub> per evitar que l'excés d'aquesta molècula pugui produir danys intracel·lulars amb espècies reactives d'O<sub>2</sub>, radicals lliures, etc. Però el cert és que aquest efecte s'hauria de veure (en cas de produir-se) molt més marcat en MIO i DFG, ja que la hipòxia en ells ha provocat majors canvis tant quantitius com qualitius, i per tant sembla lògic d'esperar que l'efecte rebot hauria de ser major, ja que ens allunyem més de la situació control. Sorprenentment, succeeix tot el contrari, en el múscul on hi han menors modificacions és on hi ha un efecte rebot més clar. Inicialment es va sospitar que eren deguts a un error humà o de calibratge. Però una vegada comprovades les dades, i després de repassar tots els procediments, calibratges i càlculs, es van confirmar els resultats.

Respecte a la tipologia de les fibres musculars només trobem diferències significatives en el percentatge de fibres entre el grup Control i el grup Hipòxic, així com entre el Control i el grup Post20<sub>d</sub> de la regió 1. També entre els grups

Post20<sub>d</sub> i Post40<sub>d</sub> de la regió 2. En la resta de grups d'estudi, regions i tipus de fibres no s'aprecien diferències significatives, encara que sí un lleuger augment en els grups Hipòxic i Post 20<sub>d</sub> del percentatge de fibres oxidatives, tot i que en 4 de les 5 regions d'estudi són de caràcter marcadament anaeròbic, amb percentatges aproximats de fibres FG del 65% al 85%. Cal assenyalar que en EDL (múscul que s'aproxima a les característiques del TA), malgrat no detectar diferències significatives, sí que s'observà una tendència a l'augment de les fibres oxidatives FOG (McGuire et al., 2003), tal i com acabem de detallar en el nostre estudi. De la mateixa manera, Sillau i Bancho (1977), Ishihara i col·laboradors (1995) i Abdelmalki i col·laboradors (1996), tampoc observaren diferències significatives després d'una exposició a hipòxia crònica en la composició de les fibres musculars del *soleus*, tot i ser un múscul majoritàriament aeròbic. En canvi Itoh i col·laboradors (1990) van descriure en el mateix múscul *soleus*, la transformació de les fibres SO cap a FOG en condicions d'hipòxia.

Globalment 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). Aquests resultats provoquen que al relacionar-los obtinguem unes diferències majors, ja que es potencien els petits efectes i es guanya amb sensibilitat (com també hem vist en el MIO i en el DFG). Malgrat que els efectes sumatoris de les variacions no són espectaculars, sí que deixen constància clara de tendències o evolucions. Per la qual cosa, no es descarta que en protocols més intensius en quant a durada i/o altura (encara que com hem vist en l'apartat 3.1.3 "*Protocol Experimental*" pàg. 69, no es recomana passar dels 5.500 metres) puguin produir-se canvis majors, ja que es pot esbrinar la tendència general vers a canvis orientats a augmentar l'oxigenació d'aquest múscul.

Els canvis més importants quantitativament parlant es donen en els camps 1 i 5 dels TA, que corresponen a la regió anterior i lateral-anterior, respectivament (veure 3.2.1.3 "*Tibialis anterior*" pàg. 75). Curiosament, aquestes dues regions

són les que tenen un major percentatge de fibres anaeròbiques, FG (depenent de la regió i grup experimental es troben entre el 75% i el 85%). A més, si tenim en compte els alts valors de FCSA en les fibres FG del TA, pràcticament tot aquest múscul presenta un caràcter anaeròbic molt marcat. A excepció de la petita regió 3, on també hi trobem les fibres SO i tenim un major percentatge de fibres oxidatives, encara que no sigui així quant a la superfície total de la citada regió (Taula 4.8 pàg. 134).

Així doncs, tenim d'un costat una musculatura clarament anaeròbica i de l'altre, una pauta de conducta totalment sedentària, ja que els animals estaven confinats a les gàbies i no realitzaven cap tipus de treball ni d'entrenament físic. En aquest sentit les fibres fast (FOG i FG) quasi mai estaven actives, ja que en el manteniment de la postura estan involucrades les fibres lentes (SO), per la qual cosa, aquestes fibres FG són poc sensibles a l'absència d'O<sub>2</sub>. Tot i així, s'observen unes lleugeres tendències, però essent aquestes les menys importants quantitativament de totes les mostres analitzades.

## **5.4 Bioquímica**

En totes les mostres, però principalment en el DFG, hem trobat vertaderes dificultats per tal d'establir estudis comparatius adients als nostres estudis enzimàtics. El nombre d'experiments duts a terme en condicions d'hipòxia intermitent, on s'estudiïn enzims marcadors del metabolisme oxidatiu en aquest múscul, és quasi bé inexistent. Els pocs que hi ha es basen principalment en paràmetres mecànics (força de contracció, contractibilitat, fatiga, flux ventilatori) o bé en hipòxies intermitents cròniques simulant l'apnea de la son: curts períodes d'hipòxia (segons o minuts), però amb una alta freqüència.

### **5.4.1 LDH**

El lactat deshidrogenasa (LDH) catalitza el pas final de la ruta anaeròbica i la seva activitat és una de les més freqüentment mesurades relacionades amb la glicòlisi i, per tant, s'utilitza per tenir una visió general del metabolisme anaeròbic (Sheafor, 2003). Una de les característiques més comuns

d'acclimatació a la hipòxia és la inhibició de la producció de l'àcid làctic, però és possible que en diferents models les estratègies utilitzades siguin diferents (Clanton & Klawitter, 2001). El LDH pot convertir el piruvat a lactat, o bé catalitzar la reacció inversa, i les dos isoformes semblen estar involucrades en el rol metabòlic (Daneshrad et al., 2003). Aquest fet podria explicar la varietat de resultats que hi ha en la bibliografia relacionats amb els canvis d'activitat LDH utilitzant alguns dels models d'hipòxia crònica, intermitent o aguda. En la majoria dels estudis en humans són exposicions a hipòxia crònica, on quasi no hi ha canvis o es detecten canvis lleus en l'activitat LDH (Green et al., 1989; Howald et al., 1990). En contraposició, l'exposició de les rates a hipòxia hipobàrica produïa increments de l'activitat total de LDH (Anderson & Bullard, 1971), i llargs cicles d'hipòxia hipobàrica intermitent induïen grans augments de l'activitat LDH en la musculatura esquelètica (Clanton & Klawitter, 2001) i cardíaca (Ostadal et al., 1981). En canvi, en els estudis realitzats per Daneshrad i col·laboradors (2003) detectaren una disminució significativa de l'activitat LDH total de rates joves i adultes.

Si ens centrem en els experiments d'hipòxia hipobàrica intermitent, els contradictoris resultats de la literatura poden ser deguts a les condicions experimentals, tal qual com el nivell d'hipòxia (severa, per sota d'una  $PO_2$  de 100 mmHg, o moderada, per sobre d'aquest valor), la durada de les sessions d'hipòxia (cicles llargs o curts) i els dies d'exposició.

Si es comparen les activitats LDH en el **MIO** d'animals adaptats a diferents altures com les fotxes andines, s'observa que no hi ha variació d'aquestes activitats (Leon-Velarde et al., 1993). No obstant, en estudis realitzats amb ovelles a 3.820 metres d'altura durant 112 dies detectaren un augment de LDH en els 2 ventricles (Ohtsuka & Gilbert, 1995). Els nostres resultats mostren clarament que 400 mmHg (5.000 m) mantinguts amb un protocol de cicle llarg (22 dies) redueix significativament l'activitat LDH en el MIO.

Aquests resultats podrien complementar aquells estudis que mostren que nivells moderats d'hipòxia indueixen un augment de l'activitat dels enzims del cicle de Krebs en el múscul esquelètic (Green et al., 1989; Melissa et al., 1997), indicant

que una activació de les rutes metabòliques aeròbiques podria anar acompanyada d'una reducció de l'activitat LDH i de la metabolització del lactat en el MIO de la rata hipòxica. Per altra banda, la major reducció en l'activitat LDH observada en les mostres Post20<sub>d</sub> indicaria que la resposta induïda per l'estímul hipòxic necessita d'un cert període de temps per a estar completament desenvolupada, encara que ja comença a realitzar-se al final de l'exposició, com es dedueix de la diferència significativa entre el Control i els grups Hipòxic i Post20<sub>d</sub>. Aquestes activitats enzimàtiques baixes tendeixen a recuperar-se i retornar als seus valors basals.

Anteriorment, en la discussió d'histoquímica del **DFG**, ja hem comentat les diferents regions, pel que fa al seu caràcter metabòlic i funcional, identificades d'aquest múscul, i que es tradueixen en trets característics morfològics i de capil·larització. Quant a les activitats enzimàtiques hi ha certa discrepància, depenent de l'activitat enzimàtica que s'utilitza com a indicador. Zibundzija i col·laboradors (1998) diferenciaven clarament la part costal de la lumbar en els diaframes d'anyells en quant a activitats enzimàtiques (LDH, SDH, ATPasa). Però en canvi, Sexton i Poole (1995) afirmaren que en les diferents zones del DFG no hi ha distincions respecte a l'activitat de la CS. En el **múscul respiratori** del nostre estudi no trobem quasi variacions entre els quatre grups. Respecte a l'activitat LDH, aquests resultats són els mateixos que els obtinguts per Ogura i col·laboradors (2005) en el seu estudi amb rates, on solament van trobar activitats més baixes d'aquest enzim quan es combinaven l'exposició a hipòxia més exercici físic curt, però intens, mentre que la hipòxia o l'entrenament per sí sols no produïen alteracions dels valors LDH. Aquesta homogeneïtat en els nostres resultats pot ser deguda a que no varia el percentatge de fibres anaeròbiques (21% aproximadament) en el DFG, ni tampoc ho fa l'àrea total anaeròbica (aproximadament 47% d'àrea de fibres FG). Són precisament aquestes fibres FG les que tenen l'activitat LDH més elevada. Com hem vist anteriorment en l'apartat d'histoquímica, els únics canvis que es produeixen es donen en les fibres SO, que tenen un metabolisme principalment oxidatiu. Experiments basats en els efectes de la hipòxia aguda o

crònica, provoquen una disminució de l'aportació d'O<sub>2</sub>, indicant que la proporció de fibres lentes sembla determinar la sensibilitat d'un determinat grup muscular vers la hipòxia (Jammes et al., 1997).

En contraposició als resultats obtinguts en el MIO i en DFG, en el **TA** hem detectat un augment progressiu, encara que no estadísticament significatiu, en l'activitat LDH. Aquests resultats concorden amb els trobats per Jammes i col·laboradors (1997) i Clanton i Klawitter (2001), però contrasten amb els treballs on no s'han trobat alteracions en les activitats LDH dels músculs esquelètics sotmesos a exercici en hipòxia (Bigard et al., 1991; Perhonen et al., 1996; Puente-Maestu et al., 2003). Aquest augment d'activitat LDH pot ser degut a que el marcat caràcter anaeròbic d'aquest múscul faci que una de les úniques maneres de rentabilitzar al màxim la mancança d'O<sub>2</sub> sigui augmentant l'activitat d'aquest enzim, ja que com veurem posteriorment en l'apartat CS, té bastant limitat el metabolisme oxidatiu i la ruta anaeròbica seria la principal alternativa per a l'obtenció d'energia.

Considerant aquests resultats, sembla raonable refermar la hipòtesi de que un programa d'hipòxia hipobàrica intermitent, com el desenvolupat en aquests estudis, podria involucrar una limitació de la transcripció del gen LDH o de l'estabilitat del RNA<sub>m</sub> del LDH en el miocardi de rata, però en canvi tindria un efecte invers en el múscul esquelètic, al menys en condicions sedentàries, com el *tibialis anterior*. En canvi, no es veuria afectat en el cas del múscul esquelètic actiu, com hem observat al diafragma.

#### 5.4.2 CS

Normalment s'empra el citrat sintasa (CS) com a marcador de la capacitat oxidativa, respiratòria o de la maquinària mitocondrial, ja que és un dels enzims claus de la matriu d'aquest orgànu, a més de ser la porta d'entrada al cicle de Krebs o cicle de l'àcid cítric (Essen-Gustavsson & Henriksson, 1984). Aquest cicle en les cèl·lules aeròbiques és la ruta comú final del catabolisme oxidatiu de tots els substrats metabòlics i, per tant, és de vital importància per a

l'obtenció d'energia en forma d'ATP (Daneshrad et al., 2000; Siu et al., 2003). Degut a la naturalesa de l'enzim i a la ruta que pertany, es detecten activitats més altes en músculs lents (Leon-Velarde et al., 1993), com s'aprecia en les nostres mostres. Per altra banda, també s'ha observat que les activitats dels enzims oxidatius no sempre es modifiquen en paral·lel. Les activitats del CS i del citocrom c-oxidasa (COX) poden canviar en direccions oposades. Això suggereix que pot haver un desacoblament entre el cicle de Krebs i la fosforilació oxidativa (Sauleda et al., 1998).

S'han realitzat nombrosos estudis per determinar la capacitat oxidativa en l'exercici físic i en la hipòxia crònica o aguda, però molts menys són els estudis realitzats amb protocols d'hipòxia intermitent. El resultat d'aquests no són del tot concloents, ja que com comentàvem anteriorment, depenen de múltiples factors. Malgrat això, la majoria de resultats coincideixen a expressar que hi ha un cert augment, no sempre significatiu, de l'activitat CS degut a l'efecte conjunt de l'exercici i la hipòxia (Abdelmalki et al., 1996; Messonnier et al., 2001).

Encara que la gran majoria dels estudis són realitzats amb rates, sovint també s'empren altres animals. Aquest és el cas de l'estudi realitzat amb ovelles exposades a 3.820 metres d'altura durant 112 dies. Aquests animals van desenvolupar un important i significatiu increment de l'activitat CS en ambdós ventricles (Ohtsuka & Gilbert, 1995). En el cas dels **MIO** del nostre estudi, en primer lloc detectem una davallada dels valors d'activitat CS, però després augmenten considerablement per sobre del Control, com es va descriure a l'experiment esmentat anteriorment. Tot i així, aquests augments no són estadísticament significatius. Altres estudis trobaren també aquest augment en condicions d'hipòxia crònica (Hochachka et al., 1983; Abdelmalki et al., 1996; Sheafor, 2003), encara que d'altres no detectaren canvis en l'activitat CS ni en la capacitat mitocondrial (Bass et al., 1989; Kayser et al., 1991; 1996; Daneshrad et al., 2000; Kennedy et al., 2001; Siu et al., 2003).

Aquesta tendència a l'alça de l'activitat CS es podria atribuir a la necessitat d'augmentar l'eficiència de metabolització de l'O<sub>2</sub> per fer front als requeriments

respiratoris o energètics en condicions d'hipòxia. Com hem vist el MIO és 100% aeròbic, per tant té les rutes glicolítiques molt limitades i una de les poques opcions que té és la de rentabilitzar al màxim el metabolisme oxidatiu. Això provocaria un major rendiment energètic per volum utilitzat d'O<sub>2</sub>, ja que al tenir aquest enzim una major activitat el podria utilitzar de manera més eficient, i obtenir una millor taxa en l'obtenció d'energia. De totes maneres, no hem d'oblidar que la CS forma part d'un cicle, i que com a tal, està format per un gran nombre d'enzims, la qual cosa implica que de res serveix que la CS tingui una major activitat si en enzims anteriors o posteriors les reaccions es veuen limitades o retardades, provocant l'efecte embut.

A nivell del **DFG** trobem que hi ha una quantitat molt menor d'estudis realitzats i molt pocs són comparables als obtinguts en la nostra investigació. Uribe i col·laboradors (1992) sotmeteren a entrenaments diaris durant 9 mesos a nivell del mar (sense cap tipus d'hipòxia) als animals d'experimentació i van aconseguir que l'activitat CS augmentés significativament en el DFG, tant en la regió costal com en la crural, però no detectaren diferències importants a nivell de la musculatura abdominal. En altres publicacions també s'han trobat diferències en l'activitat CS durant la hipòxia, però en combinació amb l'exercici (Sanchez et al., 1991; Bigard et al., 1992; Powers & Criswell, 1996; Ogura et al., 2005). També s'ha descrit que per a una mateixa espècie els valors de l'activitat CS augmenten en l'altura (Sheafor, 2003). Tot i així, a l'igual que Lawler i col·laboradors (1994), tampoc no trobem canvis en les activitats CS dels DFG, encara que l'estudi citat es basa en l'exercici físic agut i extenuant, enlloc de la hipòxia. En contraposició, en estudis clínics amb pacients que patien malalties pulmonars obstructives cròniques (aquest grup de patologies provoquen hipòxia hipoxèmica), s'ha observat en les biòpsies del DFG d'aquests malalts que la capacitat oxidativa augmentava, ja que incrementava l'activitat SDH, un altre dels marcadors metabòlics oxidatius més emprats (Levine et al., 2002), a més d'un increment en la concentració mitocondrial (Orozco-Levi et al., 1999). No obstant, aquesta hipòxia és de caràcter crònic i s'ha vist que els



efectes de la intermitència hipòxica en nombrosos paràmetres reacciona diferencialment.

On trobem més bibliografia relacionada amb el CS és en els **músculs esquelètics locomotors**, degut a una més fàcil accessibilitat i obtenció del múscul que en les mostres anteriors, sobretot en el cas dels humans, i a l'interès pràctic, que té sobretot en el camp de l'esport. Diferents estudis comenten els increments de l'activitat CS, però en la gran majoria són deguts a la suma d'hipòxia i d'entrenament físic (Terrados et al., 1990; Murakami et al., 1994; Perhonen et al., 1996; Melissa et al., 1997; Masuda et al., 2001; Puente-Maestu et al., 2003; Siu et al., 2003; Luedeke et al., 2004), o només amb entrenament, sense hipòxia (Essen-Gustavsson & Henriksson, 1984; Hoppeler et al., 1985; Desplanches et al., 1996).

En determinats casos els animals foren exposats només a hipòxia i es comparà les alteracions de dues musculatures esquelètiques locomotores de característiques diferents: el *soleus* (múscul majoritàriament compostat per fibres SO) i el *gastrocnemi* (amb una composició de fibres mixta). Detectaren disminucions no significatives en ambdós músculs, però amb diferent grau, donant-se les diferències més marcades en el *soleus* (Pastoris et al., 1995). En d'altres estudis també detectaren una disminució, en aquest cas significativa, de l'activitat CS en el múscul esquelètic locomotor, després d'un protocol d'entrenament de resistència o d'expedicions extenuants (Howald et al., 1990; Masuda et al., 1999) o quan es comparen poblacions de característiques similars (edat, nivell social, activitat física) que viuen a diferents altures (Howald et al., 1990; Desplanches et al., 1996).

En el present estudi, com ja succeïa amb el DFG, no detectem grans canvis en l'activitat CS, però sí una tendència a la baixa, degut a la hipòxia en el **TA**, com també havien descrit anteriorment, però amb hipòxia crònica, altres investigadors (Kennedy et al., 2001; Sheafor, 2003). De fet, la capacitat oxidativa dels músculs esquelètics locomotors decreix després d'una exposició a

hipòxia crònica (Luedeke et al., 2004), encara que aquestes disminucions solen associar-se a la pèrdua de massa muscular.

La baixa activitat física de les rates sotmeses al programa d'exposició a la hipòxia en aquest estudi podria explicar la manca de diferències observades en els nivells d'activitat del CS al múscul TA. El poc pes quantitatiu que, com ja hem vist (Taula 4.8, pàg. 134), representen les fibres oxidatives en els TA estudiats s'hauria de considerar també com a factor determinant de la mencionada absència d'alteracions. El fet que sigui un múscul marcadament anaeròbic pot influir en el fet que tingui una activitat CS bastant restringida o limitada i per la qual cosa no es trobi excessivament afectat per la baixa disponibilitat d'O<sub>2</sub>, essent poc sensible a les seves baixes pressions parcials, ja que la font principal d'obtenció d'energia no seria per la via aeròbica.

En músculs esquelètics amb característiques més oxidatives pot ser cabrien esperar un altre tipus de respostes més similars a les trobades a les zones oxidatives del diafragma.

### 5.4.3 LDH/CS

L'índex de les dues activitats enzimàtiques (LDH/CS), és usat generalment com un indicador dels ajustaments relatius entre el metabolisme anaeròbic i aeròbic, (Hochachka et al., 1983, veure apartat 3.3.3.4 "*Índex d'activitat LDH/CS*", pàg. 89). Aquesta ràtio indica que valors elevats impliquen alt predomini de l'activitat anaeròbica, en contraposició, valors baixos expressen activitats oxidatives elevades.

Si ens basem en la representació gràfica al confrontar les dues activitats observem unes clares distribucions diferencials depenent de la mostra i del grup experimental.

En el **MIO** en primer lloc observem reduccions de les activitats LDH i augments d'activitats CS. Si ens fixem més, detectem que les disminucions de LDH es realitzen abans en el temps que els increments de CS. Mentre que en els grups Hipòxic i Post20<sub>d</sub> trobem poca variació de CS, sí que existeix una disminució

marcada de LDH. En canvi, en el grup Post40<sub>d</sub> els valors de LDH ja tornen als valors de sortida del Control, però la CS encara augmenta. Aquestes variacions segueixen el que sembla ser un clar cicle d'histèresi si unim els 4 grups, considerant-los com estacions intermèdies d'un recorregut tancat. El MIO té un metabolisme principalment aeròbic i curiosament es produeix abans el canvi del marcador del metabolisme anaeròbic (LDH), essent aquest significatiu. En canvi al marcador del metabolisme oxidatiu no hi han alteracions significatives.

En contraposició el **DFG** no segueix un patró tant ben definit. En primer lloc es produeix la disminució de CS, en el grup Hipòxic, i després en el grup Post20<sub>d</sub> un augment d'aquesta activitat, per sobre del Control, sense que en cap d'aquests 2 grups es produeixi canvi en l'activitat LDH. Finalment, en el Post40<sub>d</sub> torna a haver-hi una disminució de CS, però acompanyada en aquest cas de l'augment de LDH.

Per altra banda, la temporalització de les modificacions del **TA** és diferent respecte al MIO. Primer es produeix una reducció de l'activitat CS en el grup Hipòxic sense produir-se variacions en l'activitat LDH. Després, en el grup Post20<sub>d</sub> els valors CS tendeixen a tornar al basal i el LDH incrementa. En el grup Post40<sub>d</sub> l'activitat LDH segueix augmentant a la vegada que la CS encara disminueix més. El TA és pràcticament tot anaeròbic i es produeix abans un canvi en el marcador del metabolisme oxidatiu (CS). Aquest fet també l'hem observat en el MIO.

Si ens fixem en els valors concrets, en el **MIO** hem detectat una disminució significativa de LDH i un dèbil augment de l'activitat CS, però en conjunt obtenim que l'índex LDH/CS disminueix, percentualment un 20%, obtenint d'aquesta manera un increment no significatiu del metabolisme aeròbic en front de l'anaeròbic, tal i com ja s'havia descrit en rates, però en condicions d'hipòxia crònica (Abdelmalki et al., 1996) i també en altres animals (Hochachka et al., 1983). Aquests resultats indicarien un increment de la funció mitocondrial en rates mascles exposades a altura simulada, com ja van suggerir Gold i Costello (1974). En contrast, en altres estudis s'ha suggerit que no hi ha canvis

metabòlics en el cor degut a l'exposició crònica a hipòxia durant varies setmanes ni per restricció de l'aliment (Vergnes, 1971; Abdelmalki et al., 1996).

En el **DFG** no detectem canvis en l'activitat LDH, així com tampoc en l'activitat CS, per la qual cosa era de preveure que el ràtio es mantindria constant.

Quant al **TA** petits augments de l'activitat LDH han estat descrits en el present estudi, que junt amb lleugeres reduccions dels valors CS fan que finalment hi hagi un augment significatiu del quocient LDH/CS, fent que predomini el metabolisme anaeròbic, tal i com havien descrit en estudis anteriors, però en circumstàncies diferents: en exercici extenuant (Howald et al., 1990) o en una expedició a l'Everest (Saltin et al., 1980). Una de les possibles respostes que poden explicar aquest fet és que en expedicions a gran altura o en exercicis extenuants i continuats hi ha una pèrdua de massa muscular, que porta a una disminució de la densitat mitocondrial i, per tant a una disminució de l'activitat i del metabolisme aeròbic i un canvi cap a l'anaeròbic (Saltin et al., 1980; Howald et al., 1990; Clanton & Klawitter, 2001). Tot i així, cal recordar que en el nostre estudi no s'ha detectat pèrdua de massa muscular ni anorèxia, per tant, les raons no serien només aquestes.

#### 5.4.4 Mioglobina (Mb)

Des de la revisió de Millikan (1939) s'està d'acord en que la mioglobina es desenvolupa en el MIO i en els músculs esquelètics en resposta a la demanda d'oxigen. Aquesta proteïna també està associada amb l'activitat enzimàtica mitocondrial i amb l'aportació capil·lar d'O<sub>2</sub> (Wittenberg & Wittenberg, 1989). Per la qual cosa, la concentració de mioglobina varia àmpliament en els diferents músculs, depenent de l'activitat i composició. A la vegada que està correlacionada directament amb la capacitat oxidativa de la cèl·lula muscular (Lee-de Groot et al., 1998). En els mamífers aquàtics s'han observat augments de la concentració de mioglobina en aquells que desenvolupen temps de

busseig més prolongats (Kanatous & Garry, 2006). Estudis subseqüents han establert que la mioglobina transporta l'O<sub>2</sub> des del sarcolema (membrana muscular) fins a la mitocòndria de les cèl·lules musculars (Takahashi et al., 1998). La mioglobina també pot jugar un paper important bloquejant l'òxid nítric (NO), el qual inhibeix la citocrom c-oxidasa mitocondrial, l'enzim terminal de la cadena respiratòria, protegint d'aquesta manera la mioglobina la respiració en els músculs esquelètics i en el cor (Brunori, 2001; Fogel et al., 2001; Kreutzer & Jue, 2006). S'estan atribuint recentment altres funcions addicionals per a la mioglobina, com per exemple limitar els efectes tòxics de les espècies d'oxigen reactives (ROS) en el cor (Garry et al., 2003). Per a una informació més detallada sobre el paper de la mioglobina en els músculs esquelètics i cardíac veure una remarcable revisió de Wittenberg & Wittenberg (2003).

Per altra banda, fou reconegut ja fa quasi 50 anys que els animals nadius a grans altituds tenien unes concentracions de mioglobina intramusculars més elevades comparades amb els animals que habitaven a nivell del mar (Tappan & Reynafarje, 1957). Poc després es va comprovar que succeïa el mateix fenomen en els humans (Reynafarje, 1962).

En estudis clàssics (Reis & Wooten, 1970) es comprovà que les fibres lentes (SO) tenen una alta concentració de mioglobina, en contraposició als baixos nivells trobats en les fibres ràpides (FOG i FG). Aquesta podria ser la raó per la qual els resultats del nostre estudi presenten unes concentracions desiguals en els 3 músculs analitzats. En el TA només una petita regió conté fibres de tipus SO, sent la gran majoria de fibres i de superfície d'aquest múscul de caràcter ràpid (99% de la superfície total), ja siguin bé oxidatives, FOG, o bé anaeròbiques, FG. Aquest fet comporta que la concentració de mioglobina en el TA sigui baixa. Per altra banda, el DFG està compost d'un 77% de la seva superfície total de fibres ràpides, mentre que la resta són lentes. Per aquest motiu, obtenim que unes concentracions de Mb majors que en el TA, però no tan elevades com en el MIO. La musculatura cardíaca, tot i que no està formada per les típiques i característiques fibres musculars esquelètiques: SO, FOG i FG (veure apartat 1.8.2.3 "*Tipus de fibres musculars*" pàg. 50), per les

seves característiques metabòliques tenen una fisiologia que s'aproximaria més al tipus SO, ja que treballen de manera sostinguda, constantment i són més resistents a la fatiga. Aquest fet comporta una alta concentració de Mb en el MIO, de fet és el múscul que té més concentració de Mb degut a les característiques abans detallades.

Com ja havien descrit Reynafarje i Morrisson (1962) en la hipòxia crònica, els nostres resultats mostren que una hipòxia hipobàrica intermitent però mantinguda, incrementa significativament el contingut de Mb en el MIO, tot i que hi ha estudis contradictoris que mostren que la hipòxia no desencadena un estímul suficient per fer augmentar la mioglobina del cor (Pietschmann & Bartels, 1985). Per altra banda, també es va observar amb aus que després de dues setmanes de captivitat, amb baixa activitat física, es reduïa la concentració de mioglobina en el cor, però no així en la musculatura de les extremitats (Pagés & Planas, 1983).

Aquest augment de mioglobina és major a mesura que ens allunyem en el temps de la finalització de l'exposició a la hipòxia intermitent. A diferència dels altres paràmetres analitzats, on al grup Post40<sub>d</sub> detectàvem una tornada als orígens dels valors estudiats, en la concentració de mioglobina detectem els valors més elevats en aquest darrer grup, el Post40<sub>d</sub> (Fig. 4.35 pàg. 147). Indicant aquest fet que els canvis en l'aclimatació són aconseguits gradualment i perduren durant més temps.

En els músculs esquelètics estudiats (diafragma i *tibialis anterior*) l'augment no és tan espectacular, fins i tot en els grups Hipòxic i Post20<sub>d</sub> del DFG els valors són lleugerament inferiors al Control, però després la concentració de mioglobina en el Post40<sub>d</sub> mostra una clara tendència a l'alça. En el TA, tot i ser un múscul anaeròbic, sedentari en el cas dels nostres animals, i amb una gran quantitat de fibres ràpides, l'efecte estimulador de la hipòxia intermitent sobre la concentració de mioglobina també es fa patent, entrant en controvèrsia amb aquells estudis on s'afirmava que només es produïa un increment de mioglobina amb l'ajuda de l'exercici (Terrados et al., 1990; Hoppeler & Desplanches, 1992; Masuda et al., 1999; Vogt et al., 2001). Fins i tot algunes investigacions no detectaren augments de la concentració de mioglobina amb hipòxia

acompanyada d'exercici en humans (Masuda et al., 2001). També Masuda i col·laboradors (1999) descriueren, que més que un augment en la concentració de mioglobina, hi hauria un increment del contingut total d'aquesta proteïna en el múscul, ja que un exercici no extrem produiria una hipertròfia muscular i un augment del volum fibril·lar, amb una major distància entre el sarcolema i el centre de la fibra. Afirmant, a la vegada, que els canvis de concentració dependrien més dels canvis morfològics de la fibra que no pas per l'efecte de l'entrenament. Tot i així, en el nostre estudi no hem apreciat augment de la massa muscular i l'increment detectat en Mb no sembla encaixar amb aquesta proposta.

Tot i la millora que pot suposar l'augment de concentració de Mb en condicions d'hipòxia, s'ha pogut observar amb l'experimentació molt recent d'animals knock-out, que aquesta proteïna no és imprescindible, ja que aquests han pogut sobreviure sense aquesta proteïna. En el MIO i en la musculatura esquelètica locomotora han hagut altres adaptacions de reprogramació dels gens per la hipòxia, com per exemple: augment de la vascularitat, canvi en el percentatge de les fibres i disminució de FCSA (Garry et al., 2000; Kanatous & Garry, 2006).

La millora del transport d'oxigen fins a la mitocòndria i la protecció dels músculs de l'efecte nociu del NO i ROS, generats com conseqüència de les condicions hipòxiques, podrien ser motius raonables per tal d'explicar els increments de Mb abans esmentats. Una revisió recent de Lahiri i col·laboradors (2006) analitza la funció ROS com a senyal de transducció per a les cèl·lules sensores d'O<sub>2</sub>. Aquestes cèl·lules estimularien uns gens específics involucrats en l'homeòstasi de l'O<sub>2</sub>, mitjançant alguns factors induïbles per la hipòxia que són fortament activats després de la hipòxia intermitent (Yuan et al., 2005).

#### **5.4.5 Proteïnes totals**

La informació sobre el contingut total de proteïnes en les diferents mostres ens és de molta utilitat per tal d'avaluar correctament els possibles canvis que es

donin en les activitats enzimàtiques i en la concentració de mioglobina. Sense aquesta dada podríem deduir erròniament modificacions que serien degudes al contingut total proteic i no a l'específic d'un enzim o d'una proteïna concreta.

Generalitzarem dient que en el MIO hi ha un lleuger augment dels valors proteics, mentre que en el diafragma i el *tibialis anterior* l'efecte és al contrari, és a dir, una petita davallada en les concentracions de proteïnes totals. De totes maneres, cap de les modificacions són estadísticament remarcables, la qual cosa sembla indicar que es realitza un canvi en el patró d'expressió de determinades proteïnes, com hem vist amb la mioglobina, però que amb el còmput general no varia la concentració total de proteïnes. Aquest fet és remarcable però no sorprenent donat que permet mantenir constant la pressió oncòtica de l'interior de la cèl·lula, un dels paràmetres de major importància pel manteniment homeostàtic del volum cel·lular.

En altres estudis s'ha vist un augment de la concentració de proteïnes mitocondrials, més per increment de la biosíntesi, que no per disminució de la degradació (Siu et al., 2003).

## 5.5 Comentaris generals

### 5.5.1 Cronologia dels canvis

En tots els paràmetres hematològics analitzats es detectà la mateixa tendència que també s'ha apreciat en la gran majoria de les característiques estudiades: histoquímiques i bioquímiques. Independentment del tipus de mostra es produeixen en els grups Hipòxic i Post20<sub>d</sub> augments dels valors que afavoreixen una major aportació d'O<sub>2</sub>, per a tornar als nivells basals del Control en el grup Post40<sub>d</sub>. Malgrat aquesta mateixa evolució s'observa un desplaçament en el temps de la corba dels canvis. Mentre que en els paràmetres HQ i BQ els majors canvis trobats són majoritàriament en el grup Post20<sub>d</sub>, en els paràmetres hematològics aquests es produeixen en el grup Hipòxic. Aquest fet indica que les respostes d'aclimatació a nivell sanguini es produeixen abans que



no pas a nivell perifèric o muscular. Aquesta major rapidesa pot ser deguda a que les modificacions hematològiques es donen de manera directa o semi-directa per l'efecte del HIF-1, que és la molècula que s'expressa en primer lloc, que a la seva vegada estimula o inhibeix l'expressió d'unes altres, com per exemple EPO i VEGF. En canvi, en els paràmetres HQ i BQ estudiats trobem una major diferència, com acabem de comentar, en la gran part dels casos, en el grup Post20<sub>d</sub>. Una explicació raonable a aquest fenomen seria que hi ha molts mecanismes metabòlics i de regulació que necessiten d'una producció de proteïnes, conduïda com resposta a hormones o d'altres factors, i que per tant requereixen de més temps per cursar. Depenent de la cascada de senyalització i dels diferents factors intermediaris la resposta pot ser més o menys tardana, de manera que l'expressió d'aquestes respostes d'aclimatació no són instantànies, la qual cosa també fa que les modificacions, donat el seu marcat caràcter estructural, perdurin més en el temps, en la majoria dels casos un mínim d'uns 30 dies.

En canvi, observem que en la gran part de les dades obtingudes i en tots els camps d'estudis (hematologia, histoquímica i bioquímica) en el grup Post40<sub>d</sub> els valors retornen als nivells de sortida i són, en certa manera, equiparables als observats en el grup Control. La durada dels temps de manteniment del canvi dependrà de si el mecanisme de resposta és més o menys costós de produir-se. En general, com més mecanismes es posin en marxa i més costin a realitzar-se aquests canvis, més temps perduraran, i a la inversa.

Aquest fet ens indica que les modificacions tenen un efecte limitat i després d'un període sense estímuls hipòxics tendeixen als valors basals o inicials, com ja hem anat veient en alguns dels apartats de resultats i discussió. Pels motius descrits, si ens interessa que els efectes hipòxics perdurin a més llarg termini, això vol dir que s'hauran d'anar estimulants puntualment i/o periòdicament, encara que s'haurien de determinar la periodicitat, la duració i la intensitat de l'estímul.

### **5.5.2 Factors generals que podrien influir sobre les alteracions dels resultats, independents a la hipòxia**

Sovint s'han associat els canvis existents en els estudis d'hipòxia a altres factors externs, donant com a conclusió que només l'efecte sumatori de diferents causes junt amb la hipòxia podria donar alteracions, i que la hipòxia per sí sola no tindria tanta capacitat per provocar modificacions. En aquesta secció intentarem discutir les possibles causes descrites en altres estudis per intentar demostrar que tots els canvis produïts són deguts només a la hipòxia, o al menys no són deguts als altres factors descrits.

#### ***5.5.2.1 Atròfia-anorèxia-pèrdua de massa muscular***

Nombrosos estudis han afirmat que la hipòxia crònica o prolongada en la musculatura esquelètica no augmenta ni la CD ni la FD, o si es produeix no és degut a una angiogènesi real, sinó que ho fa per disminució de les FCSA, fet que fa augmentar en primera instància la FD i després la CD (Snyder et al., 1985). Aquest decrement de les FCSA el relacionen amb la pèrdua de la massa muscular o atròfia (Hoppeler & Voght, 1991; Hoppeler & Desplanches, 1992; Mathieu-Costello, 2001). En el nostre cas, com hem vist en tots els músculs de l'estudi, el protocol intermitent no va produir disminució dels pesos absoluts dels animals ni dels pesos relatius dels músculs estudiats (pàg. 102). Per la qual cosa, les modificacions estructurals i morfomètriques observades no deriven d'una alteració morfològica o de pes de la musculatura, ja que no hi va haver pèrdua de massa muscular ni atròfia.

#### ***5.5.2.2 Baixes temperatures/fred***

Un altre dels factors que es creu clau en l'estimulació de la hipòxia per tal de provocar l'angiogènesi és el fred (Askew, 2002). Banchemo i col·laboradors (1987) afirmaren que només en condicions d'hipòxia i de fred es produeix neoformació de capil·lars en la musculatura esquelètica. Al nostre estudi tots els animals es van mantenir en les mateixes condicions ambientals d'estabulació (pàg. 67), tret dels períodes d'exposició a la hipòxia en al cambra hipobàrica. Degut a la manca de variacions en els registres dels termòmetres i higrometres

situats a l'interior de la cambra hipobàrica, aquest factor es descarta completament com a possible causa d'augment de la capil·larització en aquest estudi.

#### ***5.5.2.3 Mala alimentació/deshidratació***

Els nostres animals experimentals han estat alimentats amb el mateix pinso i en les mateixes condicions de disposició que els Control, per la qual cosa aquest factor també es descarta. De manera anàloga succeeix amb la disponibilitat d'aigua, ja que tots els grups van tenir la mateixa accessibilitat per aquest líquid. A més, com hem pogut observar no s'ha produït una evolució anòmala del creixement en les rates exposades a la hipòxia intermitent, fins i tot aquests animals tenien un pes lleugerament superior (pàg. 102).

#### ***5.5.2.4 Desenvolupament/ creixement dels animals***

Durant la planificació de l'estudi es plantejà el dubte de saber si l'efecte del desenvolupament i maduració dels animals podria influenciar, alterar o emmascar els resultats obtinguts. Els animals d'aquest estudi tenien a l'inici del protocol experimental una edat de 6 setmanes i al final 18 setmanes (4,5 mesos).

Després de revisar la literatura científica sobre el tema, arribarem a la conclusió que aquest factor, tenint en compte l'edat dels nostres animals i la durada de l'experiment, no tindria importància quantitativa. A continuació es detallen alguns arguments en aquest sentit.

Els resultats obtinguts no poden ser atribuïbles al procés de maduració o creixement dels animals, ja que en el període comprès entre els 8 dies i els 3 mesos d'edat es produeix un augment de la FCSA en la musculatura esquelètica i en el DFG, així com una disminució de l'índex CCA (Smith et al., 1989), com també una disminució hiperbòlica de CD amb el creixement (Tamaki, 1985). Fets contraris als nostres resultats on observem que els canvis es produeixen en sentit oposat, és a dir, disminució de FCSA i augments de l'índex CCA i la CD.

En el mateix sentit, la FCSA augmenta linealment amb el pes corporal en molts animals, entre ells els rossegadors (Sillau & Banchemo, 1977). En el present