



Respostes adaptatives sanguínies i musculars en condicions d'arribada limitada d'oxigen

Santiago Esteva i Gras

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

**RESPOSTES ADAPTATIVES SANGUÍNIES I
MUSCULARS EN CONDICIONS D'ARRIBADA
LIMITADA D'OXIGEN.**

Tesi Doctoral

Santiago Esteva i Gras

4. Discussió General

“Respostes adaptatives sanguínies i musculars en condicions d’arribada limitada d’oxigen”

Actualment, està augmentant el nombre de persones que realitzen viatges i excursions d'oci i que s'exposen a mitjana o a gran altura. Clars exemples d'aquestes activitats són el muntanyisme, el trekking, l'alpinisme o les expedicions organitzades a l'alta muntanya (Askew, 2002; Hadolt & Litscher, 2003). A més a més cal remarcar el fet que, més de 140 milions de persones habiten, treballen o desenvolupen alguna activitat entre els 2.500 i els 5.500 metres d'altitud de manera regular, dels quals uns 25 milions hi viuen de manera permanent. Aquests últims els trobem principalment a l'est i sud d'Amèrica: altiàndes andí, bolivià, mexicà, i al continent asiàtic: altiàndes del Tibet, Pamir, Iran, Pakistan i Afganistan (Powell & Garcia, 2000; West, 2002). Tot i que menys estudiades, també hi ha certes poblacions africanes establertes a l'altiàndes etiop les quals són, possiblement, pioneres en la conquesta de la gran alçada (Xing et al., 2008).

D'aquí se n'extreu l'interès per conèixer els processos d'aclimatació i adaptació a l'altura. És per aquesta raó que aquest treball ha estat enfocat principalment en l'estudi dels diversos mecanismes de resposta i d'adaptació a condicions hipòxiques: hematològics, reològics, morfològics i bioquímics. S'ha aprofundit principalment en la hipòxia hipobàrica intermitent (altitud simulada en cambra de baixa pressió) tot contrastant-la amb un protocol de restricció hipoxèmica (anemització per flebotomia seriada).

Diversos estudis han reportat que la hipòxia crònica indueix efectes deleteris en la **massa muscular** depenent de l'alçada i el temps d'exposició (Boyer & Blume, 1984; Fulco et al., 1985; Rose et al., 1988). Fins i tot aquests efectes s'han demostrat en certs protocols d'hipòxia hipobàrica intermitent (Morel et al., 2005; Siques et al., 2006). Aquest fet s'explica mitjançant el balanç energètic negatiu que produeix la hipòxia degut, principalment, a una reduïda ingesta d'aliments (Cerretelli & Hoppeler, 1996; Westerterp et al., 2000). Tanmateix, degut al suposat baix grau d'exposició hipòxica a què estan sotmesos els animals en els nostres protocols, no vàrem detectar efectes negatius en la taxa normal de creixement dels animals sotmesos a HHI i tampoc en els grups controls (els pesos dels animals sotmesos al protocol

d'hipòxia no patiren gaires variacions respecte als controls). Això podria indicar que el nostre règim d'exposició ofereix una bona compatibilitat amb les condicions normals de vida dels animals en qüestió ja que, a més a més, els animals només veieren interrompuda l'opció d'alimentar-se durant el període d'exposició a hipòxia (Kayar & Banchemo, 1985; Deveci et al., 2002; Deindl et al., 2003).

Els **paràmetres hematològics** obtinguts en cada un dels grups experimentals, recolzen els resultats també obtinguts amb anterioritat en rates (Siques et al., 2006; Germak et al., 2002) i en humans (Casas et al., 2000a; Heinicke et al., 2005; Wehrin et al., 2006). Una de les adaptacions més destacable del nostre programa d'aclimatació és, probablement, aquella observada en l'hematologia. L'augment significatiu de glòbuls rojos, Hc i concentració d'Hb dels animals sotmesos a condicions hipòxiques, està relacionat amb un augment de la capacitat de transport de l'O₂ sanguini. Conseqüentment, podem observar que l'exposició a hipòxia intermitent també pot estimular l'eritropoesi en la rata, tal com ja estava altament demostrat en l'exposició crònica a hipòxia d'aquests animals (Lamanna et al., 1992; Rivera et al., 1994; Biljanovic-Paunovic et al., 1996). Les lleugeres diferències en els índexs hematimètrics en els animals sotmesos al protocol HHI, poden ser degudes a la influència d'un percentatge significativament elevat de reticulòcits en el torrent sanguini (Rodríguez et al., 1999; Savourey et al., 2004). La presència d'aquestes formes immadures serien les causants d'un petit augment del volum de cèl·lules sanguínies.

A baixos valors de gradient de velocitat, els valors de **viscositat de sang** total per tots els grups de rates foren notablement més alts que aquells descrits ja en humans en el nostre propi laboratori (Rodríguez et al., 1999). Com a conseqüència de l'augment del paquet cel·lular induït per un programa d'exposició a hipòxia intermitent, hom esperaria un major augment de la viscositat de la sang. En canvi, el que obtinguérem fou una variació no significativa de les característiques hemoreològiques tot i que, en el grup hipòxic, s'observà una lleugera tendència a l'augment de viscositat

especialment a baixos gradients de velocitat. És a dir, s'observà una tendència coherent cap a valors incrementats de la viscositat de la sang total quan els animals foren sotmesos a hipòxia.

Aquest efecte reològic és més aparent a baixos gradients de velocitat que a valors alts, el que indicaria dinàmiques diferents entre la deformabilitat eritrocitària (el principal factor que influeix en la viscositat sanguínia a alts gradients de velocitat) i l'agregabilitat eritrocitària (el factor més destacat que afecta a la viscositat a baixos gradients de velocitat) (Chien et al., 1970). Els nostres resultats indicarien, a més a més, que l'agregabilitat dels eritròcits de les rates podria ser un factor igualment limitant per el subministrament d'O₂ de la sang cap als teixits, com ho és la seva deformabilitat.

La presència d'alguns efectes compensatoris podrien, eventualment, prevenir els efectes negatius evocats per un increment excessiu de la viscositat sanguínia. El descens dels valors de la viscositat plasmàtica i també possibles canvis microreològics del eritròcits (com els estats de deformació i agregació, els quals són els responsables del comportament estructural, tixotròpic i viscoelàstic de la sang) poden ser els principals factors conductors d'aquestes respostes compensatòries. La concentració de proteïnes plasmàtiques mostrà una variació en sentit similar als canvis de viscositat plasmàtica (Viscor et al., 1984; Letcher et al., 1981). A més a més, és interessant destacar que la concentració plasmàtica de fibrinogen segueix fortament aquest mateix patró de canvi tot mantenint aproximadament, i en qualsevol cas, un 25‰ del total de massa proteica. Convertino (1991) ja publicà que un canvi en la concentració de proteïnes intravasculars pot ser un mecanisme de canvi del volum sanguini. Les proteïnes podrien ser transferides cap al fluid intersticial o des d'aquest. El canvi en la concentració de proteïnes vasculars abocaria variacions en el volum plasmàtic a través de bescanvis de compartiment de l'aigua intersticial cap dins o fora del sistema circulatori. Una resposta similar encarregada de regular la viscositat sanguínia ha estat descrita en ratolins transgènics, els quals sobreexpressaven l'EPO (Vogel et al., 2003). Certs canvis en el comportament reològic durant

l'exposició a hipòxia també poden afectar notablement la microcirculació en teixits perifèrics (Zengren et al., 1999).

Malgrat les notables diferències en els valors d'Hc, concentració d'Hb i viscositat sanguínia en menor grau, els valors dels **índexs oxygen carrying capacity i oxygen delivery** foren força similars en els quatre grups experimentals estudiats i només lleugerament afectats per l'augment dels valors d'Hc de les rates H. Existiria un possible efecte compensatori reductor de l'impacte del volum de la massa eritrocitària sobre la viscositat sanguínia. La influència de l'Hc en el transport sistèmic d'O₂ ha estat sempre un punt d'interès degut a la seva acció dual, però amb efectes oposats: un augment d'Hc va acompanyat d'un increment lineal en la capacitat de transport d'O₂ de la sang tot i causar un increment exponencial de la viscositat (Birchard, 1997).

A part del ja descrit ajustament entre Hc i viscositat sanguínia, d'altres factors com la densitat capil·lar o la redistribució de flux sanguini regional, poden permetre mantenir un adequat nivell d'entrega d'O₂ als teixits. És en aquest punt on ens podem valdre de la teoria de l'Hc òptim. Aquesta teoria, àmpliament utilitzada en estudis amb animals (Hillman et al., 1985; Withers et al., 1991; Birchard, 1997), sosté que l'Hc esdevé òptim en el punt màxim de la relació existent entre el flux d'O₂ (capacitat transportadora d'O₂/viscositat) i l'Hc. Teòricament, hem de suposar que, a un augment de l'Hc li correspondria un increment proporcional en el transport d'O₂ o el que és el mateix, es permetria assolir una capacitat incrementada en el consum d'O₂. Però aquest augment en el transport d'O₂ arribaria un moment en que es saturaria degut a l'augment excessiu d'hematies en sang i al corresponent augment dels valors de viscositat, que limitarien el flux d'O₂ als teixits. Així doncs, l'Hc ha de ser optimitzat degut a la seva influència ambivalent sobre el transport d'O₂. Pel fet que l'endoteli s'encarrega de regular el diàmetre dels vasos sanguinis, s'hipotetitza que l'Hc pot ser regulat a prop de l'òptim mitjançant canvis en el volum plasmàtic (Birchard, 1997). Viscor et al. (2003) ja obtingueren resultats similars en estudis comparatius en diferents espècies de vertebrats.

El **TA** és un múscul anaeròbic de la pota no massa utilitzat per l'animal durant el protocol d'aclimatació. Per tant, durant l'exposició a hipòxia, es pot considerar que només músculs posturals i fibres SO foren activades. En aquest múscul les fibres predominants FOG i FG no foren afectades per la baixa pressió d'O₂ i, degut a aquest fet, les diferències que trobem en la capil·laritat muscular i morfometria de les fibres són poc significatives. Pel que fa al múscul **DG**, les característiques metabòliques són predominantment oxidatives (mescla de SO i FOG). De la mateixa manera que en el TA, en aquest múscul tampoc trobem diferències significatives remarcables en quant a la variació del percentatge del tipus de fibres (Wüst et al., 2009). Quan comparem els grups C i H, sí que trobem certes diferències significatives en la capil·larització muscular total i en els paràmetres morfomètrics de les fibres SO (les fibres que estan actives durant el treball normal d'inspiració). El protocol HHI també sembla ser que podria induir alguns canvis en el nombre total de capil·lars i en la morfometria de les fibres del DG. Aquests resultats són un xic sorprenents tenint en compte que la hipòxia incrementa la freqüència respiratòria i fa augmentar el treball d'aquests músculs per unitat de temps (Thomas & Marshall, 1997). En aquest punt dedim que d'altres músculs inspiratoris intercostals podrien donar suport al DG en la tasca de compensació de l'increment de ventilació.

Després del programa HHI, s'observà una reducció de l'activitat LDH del **MC** de la rata i una potenciació del seu caràcter oxidatiu mitjançant l'increment de l'activitat CS i la concentració de mioglobina als 20 dies d'acabar l'exposició. Tanmateix, en el TA i el DG no s'observen diferències significatives en l'activitat LDH i CS i tampoc en la concentració de Mb. Això es podria deure al fet de ser una exposició passiva a la hipòxia sumat a l'absència d'exercici en els grups experimentals.

Wüst i col·laboradors (2009) demostren que les adaptacions a la hipòxia són específiques de cada múscul estudiat i fins i tot específiques de cada una de les regions d'aquests músculs. Aquests autors observaren que diferents regions del múscul *plantaris* de rata responien de forma diferent quan eren

sotmeses a un estat perllongat d'hipòxia. Certes alteracions significatives en la mida de la fibra, l'activitat SDH i el subministrament capil·lar a la fibra, prevenien l'aparició d'àrees anòxiques en regions interiors i no en les superficials. Per tant, es determinà una adaptació específica de cada regió pel que fa al grau d'oxigenació tissular, tot mantenint la pressió d'O₂ crítica en cada una d'aquestes. Diversos estudis demostren aquest fet (Sillau & Banchemo, 1977; Snyder et al., 1985; Deveci et al., 2001; Faucher et al., 2005).

Pel que fa als paràmetres d'**estrès oxidatiu** obtinguts en animals després d'haver-los sotmès al nostre protocol d'hipòxia intermitent, podríem definir-los com a positius si atenem a les possibles aplicacions futures de la HHI. A la literatura trobem treballs on els animals sotmesos a hipòxia intermitent han experimentat un augment significatiu dels paràmetres indicadors de l'estrès oxidatiu (Row et al., 2003; Xu et al., 2004). Aquest fet també s'ha constatat en períodes intermitents d'hipòxia en humans (Lavie, 2003; Magalhaes et al., 2004; Suzuki et al., 2006; Pialoux et al., 2009). Tot i això, els resultats obtinguts en el nostre laboratori no ens han mostrat diferències significatives en cap dels paràmetres analitzats (CAT, SOD, TBARs) quan els 4 grups experimentals han estat comparats entre ells. No obstant, en els TBARs s'aprecia una lleu tendència a l'alça en el grup H, com seria d'esperar després d'una agressió hipòxica. Estudis amb diferents condicions d'hipòxia han demostrat que, una producció més elevada del normal de ROS jugaria un paper important en la protecció futura enfront l'estrès oxidatiu. Aquest augment de producció de ROS, també ajudaria a millorar l'expressió dels gens antioxidants per tal que aquests poguessin limitar els conseqüents danys cel·lulars (Chen et al., 2003; Das & Maulik, 2006). En totes les espècies animals ha anat desenvolupant-se un elaborat sistema de defensa a diferents nivells de protecció cel·lular contra radicals lliures. S'ha comprovat que diferents components seleccionats d'aquest sistema de defensa han estat incrementats en teixits entrenats o exposats a condicions extremes després d'un període d'entrenament/aclimatació (Metin et al., 2003; Alessio & Goldfarb, 1988; Ji et al., 1988).

Pel que fa als valors dels paràmetres hematològics, reològics, histoquímics i bioquímics obtinguts després del protocol HHI, apreciem una tendència similar a llarg dels 4 grups experimentals. Independentment del tipus de mostra i paràmetres analitzats, els valors obtinguts en els animals dels grups H i P20 estan augmentats en comparació amb els dels altres grups. Dit en altres paraules, després del programa d'exposició intermitent a hipòxia apreciem un augment de diversos paràmetres, el que afavoriria el subministrament d'O₂ a nivell perifèric. Aquests efectes es perllonguen durant als menys els 20 dies posteriors a l'inici del protocol i, tanmateix, ja no es troben en el grup P40 en el que trobem valors similars als basals. Tot i que aquesta evolució es produeix en la majoria de paràmetres estudiats, els majors canvis hematològics i reològics es troben en el grup H, mentre que els canvis més notables a nivell bioquímic i histoquímic s'observen en el grup P20. Aquests resultats indiquen l'existència de dues cinètiques diferents en les respostes. Observem uns canvis a nivell sanguini produïts d'una forma directa per l'efecte de l'alliberament de EPO induït pel HIF-1, la molècula encarregada de senyalitzar les condicions d'hipòxia tissular i que estimula la producció de molts altres missatgers. I, per altra banda, en els paràmetres bioquímics i histoquímics, els canvis serien més tardans ja que s'haurien de posar en marxa tota una sèrie de processos i cascades d'esdeveniments més triganers. La producció de proteïnes i els canvis en l'organització estructural subcel·lular venen determinats per canvis en l'expressió de gens en resposta a hormones o d'altres factors, que encara que siguin d'activació immediata, requereixen un llarg temps pel seu desenvolupament.

El que s'observà de manera homogènia en gairebé tots els paràmetres estudiats, fou una tornada als valors basals en el grup experimental P40, és a dir, l'efecte de l'aclimatació a hipòxia aconseguit mitjançant al protocol HHI s'hauria revertit després d'aquest període de temps. Aquest darrer fet ens indica que les modificacions tenen un efecte limitat en el temps i que, després d'un període sense estímuls hipòxics, es tendeix a retornar als valors inicials. Per tant, 40 dies després de finalitzar l'exposició, les rates han perdut pràcticament tots els reajustaments fisiològics induïts pel programa HHI.

Aquest *time course* observat en la rata no es diferencia massa del descrit en humans, tenint en compte les diferències existents en la sensibilitat enfront de la hipòxia entre totes dues espècies (Rodríguez et al., 2000). I, tot i que l'eficiència dels diferents mètodes d'exposició a hipòxia en humans ben entrenats roman encara controvertida (Truijens et al., 2008), aquest protocol HHI podria ser considerat seriosament per a programar exposicions hipòxiques intermitents: pre-aclimatacions d'expedicions a alta muntanyes o per esdeveniments de competició d'esports aeròbics. Dependrà de l'objectiu o missió de l'estudi, el fet d'utilitzar un protocol més o menys llarg i més o menys intens per tal que els canvis induïts per l'efecte de la hipòxia es mantinguin el temps necessari. Tot i que encara són necessaris més estudis per corroborar-ho, es pot observar que la taxa de desaclimatació no és sempre tan ràpida com ho és la d'aclimatació a l'altitud (West et al., 2007). Aquest fet suggereix que la hipòxia intermitent afavoriria de forma neta el procés d'aclimatació. També quedaria per esbrinar si, breus períodes d'exposició intermitent a hipòxia podrien interrompre aquest procés de desaclimatació, ja que no resulta una idea desgavellada aplicar dosis recordatori pautades d'hipòxia un cop acabat el protocol HHI. Aquesta modificació en el nostre protocol HHI podria afavorir el perllongament en el temps dels diversos canvis i adaptacions aconseguits.

Per contrastar els resultats obtinguts aplicant el protocol HHI abans descrit amb unes condicions d'hipoxèmia sostinguda, varem dissenyar un procediment d'anemització que suposés també una limitació en el subministrament d'O₂ als teixits. S'utilitzà un procediment d'anemització per no haver de sotmetre els animals a unes condicions d'hipòxia hipobàrica crònica que, tal com ha estat comentat anteriorment, produeixen greus conseqüències a nivell de pèrdua de musculatura. L'estudi, en aquest cas, es feu en els músculs **SOL** i **EDL**.

En les rates anèmiques s'observà una clara disminució de la capil·larització en el SOL juntament amb una també clara, però menys marcada, tendència en l'EDL. Aquest fet es podria explicar gràcies al simultani increment de l'àrea

de la secció transversal de la fibra mentre es manté el nombre de capil·lars. Es trobaren diferències significatives en els volums mitocondrials en cada una de les regions estudiades (pericapil·lar, sarcolemal i sarcoplasmàtica) i, fou en els animals anèmics, on els valors foren més baixos en cada una de les regions dels dos músculs. Aquests canvis estan associats a una proporció significativament més elevada de fibres ràpides en el SOL de rates anèmiques que en les NA. Per tant, podem concloure que la hipòxia hipoxèmica causa una reducció del volum mitocondrial de les zones estudiades, malgrat que un patró proporcional i comú de distribució zonal fou mantingut en les fibres. Pel que fa als metabòlits estudiats, es van trobar concentracions més altes en ambdós músculs de les rates sotmeses al protocol hipoxèmic en comparació amb les no anemitzades. L'increment de metabòlits i de fibres ràpides fou més acusat en el múscul SOL en comparació amb l'anaeròbic EDL.

En resum, podem afirmar que, una situació d'hipòxia provoca un estat d'estrès a la majoria d'animals que la pateixen. Per tal d'afrontar aquesta baixa disponibilitat d'O₂, l'organisme es veuria forçat a desenvolupar estratègies efectives per fer front a aquesta nova situació. L'organisme és capaç de dur a terme ajustaments fisiològics y morfològics per tal de mantenir un mínim nivell de metabolisme aeròbic durant aquestes condicions de transport limitat d'O₂ als teixits. Aquests ajustaments segueixen el principi de simmorfosi, mitjançant el qual, la formació d'elements estructurals en els organismes animals és orientada a aconseguir una reestructuració equilibrada per tal d'adaptar-se a les noves situacions, però sense excedir els requeriments funcionals necessaris (Taylor & Weibel, 1981). Aquest principi fou proposat en primer moment en estudis sobre la relació entre estructura i funció en el sistema respiratori dels mamífers i, des de llavors, ha estat establert com una hipòtesi general de disseny econòmic (Weibel et al., 1998; Weibel, 2000). Tot i que la simmorfosi no es un principi general, pot ser aplicat a una gran varietat de casos i condicions. En els nostres estudis aquest principi significaria que, les respostes hemato-reològiques i a nivell central (respiració i control cardíac) induïdes per una situació hipòxica, han

estat acompanyades d'uns ajustaments en el bescanvi de gasos i de la capacitat oxidativa a nivell perifèric, especialment en múscle esquelètic i miocardi. També pren cada vegada més importància l'estudi del preconditionament hipòxic, on breus períodes d'exposició hipòxica preadapten diversos òrgans (inclòs el SNC) a tolerar possibles situacions futures de baixes concentracions d'O₂ (Lutz et al., 2003; Peña & Ramírez, 2005; Ramírez et al., 2007). Després de dur a terme els nostres protocols HHI i d'anemització, podem concloure que els reajustaments fisiològics i morfològics desencadenats en totes dues condicions poden ser utilitzats com a procediments que permetin orientar aquestes respostes adaptatives vers canvis transitoris o permanents. Tots aquests canvis fisiològics tindrien múltiples aplicacions a la medicina de muntanya, de l'esport i en d'altres futures aplicacions biomèdiques (Viscor et al., 2009).