



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

1. Introducció

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

La major part dels organismes, incloent-hi tots els metazous, necessiten oxigen molecular (O_2) per sobreviure. L' O_2 serveix com a acceptor primari d'electrons en moltes reaccions cel·lulars orgàniques i inorgàniques i és aprofitat pel mitocondri per generar ATP via fosforil·lació oxidativa. Baixos nivells d' O_2 (hipòxia) s'acostumen a associar a diverses patologies com els períodes isquèmics en el miocardi, accidents vasculars cerebrals (AVC), inflamacions o tumors sòlids. Tanmateix, també es produeixen microambients hipòxics en el desenvolupament embrionari i adult, tot promovent la diferenciació de cèl·lules sanguínies, vasos sanguinis, placenta i cor (Ramirez-Bergeron & Simon, 2001). Per tant, l' O_2 pot ser també considerat com un senyal que modela el sistema cardiovascular durant l'embriogènesi. L'homeòstasi d' O_2 en teixits és mantinguda per múltiples processos cel·lulars i sistèmics, i molts dels mecanismes moleculars involucrats van coneixent-se cada vegada més.

Tant els mamífers com les aus, han desenvolupat una sèrie d'estratègies efectives per afrontar aquesta reduïda disponibilitat d' O_2 . Aquests animals assoleixen tolerància als estats d'hipòxia mitjançant una reducció del seu metabolisme, prevenint el dany cel·lular i mantenint la integritat funcional (Ramirez et al., 2007).

Respostes dependents al factor induïble a la hipòxia (*Hypoxia-Inducible Factor*, HIF)

Una resposta crítica enfront de la hipòxia és intercedida a través de canvis en l'expressió de gens, essent aquests regulats pels factors induïbles a la hipòxia (HIFs). Els HIFs són membres de la família de les *helix-loop-helix* (bHLH)-PAS de sensors ambientals i, tal com es pot veure en la Fig. 1, s'uneixen als promotors o potenciadors dels gens diana de seqüències canòniques d'ADN (*hypoxia response elements*, or HREs) (Semenza, 1999). El HIF és un factor de transcripció proteic heterodimèric que s'expressa de forma constitutiva i està format per una subunitat alfa (HIF-1 α) i una altra de beta (HIF-1 β o també anomenada ARNT *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear*

Transporter). Aquest factor pot arribar a activar fins a 200 gens, els quals codifiquen per proteïnes que regulen el metabolisme cel·lular, proliferació, supervivència, motilitat, integritat de la membrana basal, angiogènesi i hematopoesi (Wenger, 2000; Giaccia et al., 2004) (Vegi's Fig. 2).

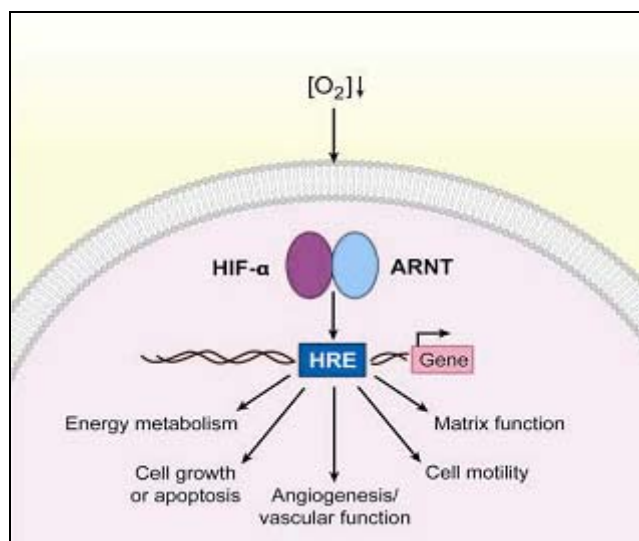


Fig.1. Resposta del HIF a la hipòxia (Simon et al., 2008).

L'activitat dels HIFs és primàriament controlada mitjançant l'estabilitat de la subunitat alfa: en condicions amb O_2 (>5% per a moltes cèl·lules), el HIF-1 α és extremadament làbil. A mesura que els nivells d' O_2 decreixen per sota d'aquest 5%, HIF-1 α comença a estabilitzar-se i dimeritza amb la proteïna constitutiva nuclear ARNT, s'uneix a HREs i estimula la transcripció dels gens (Wenger, 2000; Caro, 2001; Schofield & Ratcliffe, 2004). Aquest fet ens permet concloure que els nivells de HIF-1 α augmenten de manera inversament proporcional a la concentració d' O_2 . També és important remarcar que el HIF-1 β (ARNT) es troba de manera constitutiva en el citosol de les cèl·lules, independentment de la concentració d' O_2 .

Estudis més recents indiquen que el HIF jugaria un paper crucial en la fisiologia cardiovascular, promovent el funcionament normal del cor i les xarxes vasculars (Brusselmans et al., 2003; Semenza, 2004a). Però, per altra banda, també es creu que aquest factor de transcripció juga un rol important en el desenvolupament de certes malalties cardiovasculars, càncers, o malalties cròniques dels pulmons. Conèixer els mecanismes d'acció i regulació del HIF també podria ajudar a crear teràpies per combatre aquestes malalties (Folkman, 1995; Semenza, 2000a; Cavallaro & Christofori, 2000).

Hypoxia-inducible HIF-1 target gene
Oxygen transport: erythropoiesis
Erythropoietin
Transferrin (iron transport)
Transferrin receptor (iron uptake)
Oxygen transport: angiogenesis and vascular tone
Vascular endothelial growth factor (VEGF)
Flt-1 (VEGF receptor 1)*
Plasminogen activator inhibitor-1
Endothelin-1*
Inducible nitric oxide synthase (NO production)
Haem oxygenase 1 (CO production)
Adrenomedullin
α_{1B} -Adrenergic receptor
Anaerobic energy: glycolysis and glucose uptake
Phosphofructokinase L
Aldolase A
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Phosphoglycerate kinase 1
Enolase 1
Lactate dehydrogenase A
Glucose transporter-1
Negative feedback regulation of HIF-1 function
p35srj (CBP/p300 antagonist)
Others
Insulin-like growth factor binding protein-1
Retrotransposon VL30

Fig. 2. Gens diana del factor induïble a la hipòxia, HIF (Wenger, 2000).

1.1. Els primers estudis hipòxics

Els primers estudis coneguts realitzats sobre canvis fisiològics deguts a la disminució de la pressió parcial d'O₂, van ser publicats pel fisiòleg francès Paul Bert l'any 1878. En el tractat *La Pressión Barométrique* ja relacionà la disminució de la pressió baromètrica amb els canvis fisiològics i patològics provocats per l'altura com a conseqüència de la reducció en la disponibilitat d'O₂ (Kellogg, 1978; Dejours & Dejours, 1992; Rudolph, 1993). A partir de llavors i fins l'actualitat, s'han anat realitzant un gran nombre d'investigacions relacionades amb aquests canvis provocats per l'altura i la hipòxia, des d'un nivell d'organisme fins a un nivell molecular.

Aquest treball que teniu davant vostre, intenta ser una petita aportació en aquest ampli camp de la hipòxia i, a la vegada, pretén ser una base per a possibles futurs estudis experimentals o més aplicats.

1.2. Varietats i classes d'Hipòxia

Entenem per hipòxia una disminució de la pressió parcial d'O₂ (ppO₂) en fase gasosa o de la tensió d'aquest en fase líquida. En situacions de normòxia, existeix un equilibri entre el subministrament d'O₂ i la demanda d'aquest en qualsevol òrgan o teixit. Quan s'altera aquest equilibri, es pot produir una menor disponibilitat d'O₂ sense que variï la demanda. Una altra situació inductora d'hipòxia seria quan hi ha un augment de la demanda d'O₂ sense que la disponibilitat d'aquest es vegi modificada. En qualsevol de les dues situacions esmentades, es produirà una caiguda de la pressió parcial efectiva d'O₂ en el teixit afectat.

Podem classificar els tipus d'hipòxia segons les causes que la produeixen o la seva durada.

Basant-nos en les causes de la hipòxia tenim:

Hipòxia d'origen ambiental:

- *Hipobàrica*: succeeix quan hi ha una disminució de la pressió atmosfèrica malgrat que la proporció d'O₂ a l'ambient és manté constant (20,9%). Degut a que la ppO₂ en l'atmosfera es redueix en disminuir la pressió atmosfèrica, la diferència de pressió entre els alvèols i la sang venosa del capil·lar pulmonar minva i, per tant, la pressió d'O₂ a la sang arterial decreix i el subministrament d'O₂ a les cèl·lules es veu disminuït.
- *Normobàrica*: es produeix quan l'aire conté una proporció d'O₂ més baixa del normal (< 20,9%).

Hipòxia d'origen patològic:

- *Hipòxica*: succeeix quan hi ha una alteració en el bescanvi pulmonar d'O₂ degut a una modificació de la ventilació alveolar o una disrupció en la barrera alveolocapil·lar, que motiva una captació d'O₂ menor de la normal. Es produeix en moltes malalties respiratòries (EPOC, asma, emfisema, pneumònia, etc).
- *Isquèmica*: succeeix quan hi ha una carència d'O₂ degut a la disminució transitòria o permanent de rec sanguini en els teixits, tant per motius fisiopatològics com quirúrgics. La pressió d'O₂ en els pulmons i la concentració d'hemoglobina (Hb) són normals, però el subministrament d'O₂ als teixits és insuficient. Pot donar-se durant una exposició extrema a baixes temperatures, per insuficiència cardíaca o en el transplantament d'òrgans.

- *Hipoxèmica*: manca de capacitat de transport d'O₂ de la sang, produïda per una hipohemoglobinèmia o per alteracions de components de l'Hb. Pot ser d'origen anèmic, és a dir, causada per una reducció de la capacitat de fixació de l'O₂ per part dels hematies (per disminució de la concentració d'Hb, del nombre d'eritròcits o per dèficit de ferro); també pot estar causada per una intoxicació (desplaçament de l'O₂ de l'Hb per altres gasos com el monòxid de carboni); o per una hemorràgia.

Basant-nos en la durada d'exposició a la hipòxia tenim:

- *Aguda*: exposició sobtada i puntual a la hipòxia. S'activen ràpidament mecanismes reguladors que impliquen sobretot al sistema nerviós.
- *Crònica*: succeeix quan una exposició prolongada indueix una resposta compensatòria d'aclimatació.
- *Intermitent*: es produeixen cicles alternatius d'hipòxia i normòxia. En certes ocasions, l'objectiu és aconseguir un efecte similar al de les aclimatacions cròniques però amb un menor temps d'exposició a la hipòxia.

Cal afegir que, dins de la hipòxia intermitent, podem trobar-hi tres sub-divisions. La **Hipòxia intermitent episòdica**, hipòxia breu que sovint passa inadvertida (vols de llarga durada, activitats de risc a moderada i gran altura, apnea de la son, etc.) (Samuels, 2004; Muhm et al., 2007; Almendros et al., 2010); **Hipòxia intermitent periòdica**, hipòxia de durada llarga (hores o dies) i que pot dependre del treball físic realitzat (expedicions d'ascens o travessies de muntanya a gran alçada) (Rose et al., 1988; Pomidori et al., 2009); i la **Hipòxia intermitent crònica**, que es desenvolupa de manera regular, permanent i al llarg del temps (com en els torns de treball alternants a gran altitud) (Richalet et al., 2002; Farias et al., 2006).

En el món dels animals també trobem diverses situacions d'hipòxia. A diferència del humans, evolutivament els animals s'han adaptat a compensar i a poder fer front a aquesta manca d'O₂. Pel que fa a la hipòxia aguda, els catxalots (*Physeter catodon*) o els elefants marins meridionals (*Mirounga leonina*) poden arribar a submergir-se dues hores a més 1000m (Hindell et al., 1991). Un exemple d'hipòxia crònica podrien ser els "talps cecs subterranis" (*Spalax ehrenbergi*) ja que viuen en caus on la pressió d'O₂ pot caure per sota dels 50mmHg (Shams et al., 2005). I un clar exemple d'animal sotmès a un període d'hipòxia intermitent seria l'esquirol terrestre àrtic (*Spermophilus parryii*), el qual passa més de la meitat de la seva vida hibernant (Ma et al., 2009). Estudiar l'efecte de la hipòxia en d'altres espècies animals, ens pot ajudar a comprendre els mecanismes que els han permès afrontar aquesta situació adversa i com aquests animals superen les limitacions funcionals imposades per la hipòxia.

Els estudis realitzats en aquest treball es fonamenten en dues situacions experimentals diferents amb l'objectiu d'aconseguir dos estats diferents de subministrament limitat d'O₂ en sang: en l'article 2 es produeix un procés gradual d'anemització mitjançant l'extracció d'un volum determinat de sang, conduint l'animal a un estat d'hipoxèmia sostinguda; en els altres articles (1, 3, 4 i 5) el subministrament limitat d'O₂ es duu a terme mitjançant un protocol d'hipòxia hipobàrica intermitent. La majoria dels estudis sobre hipòxia s'han centrat en protocols d'exposicions cròniques o agudes, i es per això que nosaltres ens hem centrat principalment en l'estudi de la hipòxia intermitent.

1.3. Per què hipòxia intermitent? Interès i hipòtesi de l'estudi

La hipòxia intermitent es defineix com una exposició a la hipòxia, de minuts a dies sencers de durada, la qual és repetida durant diversos dies. Cada un dels períodes hipòxics està temporalment separat del següent per un temps de retorn a normòxia o a nivells d'hipòxia menys severos (Powell & Garcia,

2000). Tal com hem comentat amb anterioritat, hi ha múltiples situacions de la vida quotidiana i diverses malalties que reflecteixen aquest patró clar d'hipòxia intermitent.

Un clar exemple que ha estat molt estudiat és la síndrome de l'apnea del son (OSA). Aquesta síndrome consisteix en episodis d'obstrucció de la via de l'aire, causant dessaturacions significatives dels nivells d'Hb. Aquests fets estan associats tant a la hipòxia com a la hipercàpnia. Els pacients amb OSA desenvolupen hipertensió (Lesske et al., 1997; Meek & Chakravorty, 2009; Drager et al., 2010), dèficits neurocognitius associats amb pèrdua de matèria grisa regional o augment de marcadors circulants d'estrès oxidatiu i inflamació (Peña & Ramirez, 2005). La hipòxia crònica intermitent també ha estat lligada a la remodelació pulmonar vascular i a la hipertensió pulmonar (Ostadal et al., 1981), i a més, evoca excitabilitat sostinguda de les neurones de l'hipocamp involucrades en l'activació dels canals L-type Ca^{2+} i receptors NMDA (Godukhin et al., 2002). D'altres episodis "negatius" d'hipòxia intermitent, com viatges o treball en altura, poden arribar a produir mal agut de muntanya, edemes pulmonar o cerebral d'altura, edemes perifèrics, retinopaties, etc.

No tot procés hipòxic intermitent és perjudicial o deleteri de determinades zones del cos, sinó que existeixen situacions d'hipòxia intermitent que demostren efectes beneficiosos. S'ha demostrat que la hipòxia intermitent té efectes antiarítmics en isquèmia aguda de miocardi (Meerson et al., 1987; Meerson et al., 1989), incrementa la durada de l'activitat respiratòria (Feldman et al., 2003), actua com a cardioprotector (Milano et al., 2002), actua en la prevenció de l'arteriosclerosi i ajuda a millorar el rendiment físic (Rodriguez et al., 1999; Richalet & Gore, 2008). Una seqüència de breus exposicions a la hipòxia (precondicionament hipòxic) poden provocar tolerància a la hipòxia en diversos òrgans: sistema nerviós, fetge, pulmó, ronyó, i músculs esquelètics. Diversos estudis han investigat els mecanismes cel·lulars i moleculars destacant-ne aquests efectes preconditionants (Dirnagl et al., 2003; Pong, 2004). També s'ha demostrat que l'eritropoetina, hormona

induïda per la hipòxia, proporciona un múltiple efecte protector: antiapoptòtic, neurotròfic, antioxidant i angiogènic (Siren & Ehrenreich, 2001). Segons Powell & Garcia (2000), els efectes fisiològics de la hipòxia intermitent es diferencien en aquells que són causa d'histèresi o en els que tenen un component de memòria sobre el sistema on actuen. La interacció entre aquests dos efectes també és freqüent, com en el cas d'histèresi en mecanismes de plasticitat neural induïda per hipòxia.

La utilització d'un protocol d'hipòxia intermitent ens pot aportar una sèrie d'avantatges respecte a les exposicions cròniques o agudes. Ens permetrà aconseguir les adaptacions pròpies de l'exposició crònica: hematològiques, respiratòries, cardiovasculars i metabòliques, amb el benefici d'evitar els inconvenients d'una exposició perllongada: problemes neurals i vasculars, deficiències cognitives, atrofies musculars, pèrdues de gana i pes, fatiga, alteracions de la son, hipertensió, estrès oxidatiu, etc. (Fulco et al., 1985; Zhuang & Zhou, 1999; Neubauer, 2001). La hipòxia intermitent també pot provocar canvis estructurals musculars per tal de millorar l'oxigenació i la utilització de l'O₂ en el múscul, mentre que la hipòxia contínua o extrema provoca un deteriorament muscular i caquèxia, tot impeding aquest aprofitament de l'O₂ (Hoppeler & Desplanches, 1992). Un altre aspecte positiu en l'ús de protocols d'hipòxia intermitent, és la possibilitat de dur a terme les aclimatacions a grans altures sense haver-nos de desplaçar a la muntanya. Per a reproduir tals condicions i, tal com veurem al llarg d'aquest treball, s'utilitzen les anomenades cambres hipobàriques. A més a més, aquests aparells permeten no haver d'alterar considerablement el ritme de vida de la persona que es sotmet a les exposicions. Les exposicions per augmentar la capacitat aeròbica en esports de resistència i preaclimatacions d'expedicions a l'alta muntanya, seran unes les principals finalitats per les quals s'utilitzaran les cambres hipobàriques.

Els estudis realitzats en aquesta Tesi, amplien i completen els anteriorment realitzats en el nostre grup. Amb anterioritat, ja s'havien realitzat estudis en humans sotmetent-los a diversos protocols d'hipòxia hipobàrica intermitent. Un cop s'establí un protocol útil d'aclimatació a gran altura, per l'estudi de possibles canvis fisiològics i per a la millora de la resistència aeròbica (Rodríguez et al., 1999; Casas et al., 2000b; Ricart et al., 2000), es decidí aplicar-lo en animals. El fet d'aplicar aquest protocol en rates, no era sinó poder determinar certs paràmetres impossibles d'avaluar en humans pel fet de ser estudis de caràcter invasiu (Rodríguez et al., 2000; Casas et al., 2001). Per tal de poder estudiar les respostes en l'intercanvi perifèric o els canvis a nivell cel·lular, optarem per treballar amb animals experimentals. Una part d'aquests estudis amb animals d'experimentació, ja foren publicats pel nostre grup de recerca (Panisello et al., 2007). Una gran part dels restants, els trobareu continguts en aquest treball.

1.4. Poblacions a gran altura. Mecanismes compensatoris.

Actualment, més de 140 milions de persones viuen i treballen a altituds per sobre dels 2500m (Niermeyer et al., 2001). Les tres grans poblacions que viuen a gran altitud són: els habitants dels Andes, els de l'Himàlaia i una població menys estudiada, els habitants del *plateau* de l'Àfrica de l'Est, a Etiòpia. Cada una d'aquestes tres poblacions té diferents fenotips i diferents estratègies per sobreviure en el seu inhòspit ambient hipòxic (Beal et al., 2002; Beal, 2007).

La comprensió de l'evolució dels humans i els animals dependrà de saber discernir les causes de les variacions entre els individus, els quals reben les bones aptituds i la base genètica de les anteriors generacions. La manera com els humans ens vam adaptar a un ambient pobre en O₂, a través d'uns canvis en l'expressió dels gens relacionats amb la hipòxia, és com un trencaclosques en el qual la majoria de peces resten perdudes encara avui

dia. Segons Xing i col.laboradors (2008), s'ha pogut demostrar que en un període curt de temps, l'evolució ha facilitat diversos avantatges de supervivència als Etiops, en menor mesura als habitants de l'Himàlaia, però no encara als Andins, els quals arribaren al seu actual lloc de residència més tardanament.

Tot i que a vegades els termes aclimatació i adaptació s'usen indistintament com a sinònims, existeix una gran diferència entre ells. Banchemo (1987) ja els definí de la següent manera:

En l'**aclimatació**, els canvis que es produeixen són temporals i transitoris. Els mecanismes que es donen són reversibles i no són transmissibles de generació en generació. Són canvis a curt termini que poden tardar des de segons fins a dies sencers a produir-se. Es presenten per tal d'apaivagar els efectes de la baixada de la pressió parcial d'O₂.

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

El procés d'aclimatació suposa la posada en marxa de diferents mecanismes que es disparen de forma progressiva com a línies de defensa de l'organisme en resposta a l'alteració ambiental. Així doncs, les respostes fisiològiques d'aclimatació a l'altura depenen del grau d'hipòxia i de la seva durada (Hochachka, 1998). Els principals mecanismes són els **respiratoris, cardiovasculars, hematològics i cel·lulars i metabòlics**. El moment d'activació d'aquests mecanismes varia força d'un a l'altre (Peacock, 1998). Alguns d'ells, com per exemple la hiperventilació o l'augment de la freqüència cardíaca, són controlats pel sistema nerviós central (SNC) i actuen de forma immediata. D'altres respostes necessiten dies o setmanes per aparèixer, com l'augment en la concentració d'Hb o en la densitat capil·lar.

Respiratoris: amb l'exposició a hipòxia observem un increment immediat en la ventilació. Trobem canvis tant en la resposta ventilatòria hipòxica, com en la resposta ventilatòria hipercàpnica. Està àmpliament establert que la resposta ventilatòria hipòxica incrementa amb el temps en altitud, en un període que va des dies a diverses setmanes. La pauta que segueixen els canvis en la resposta ventilatòria hipercàpnica és exponencial i la meitat tenen lloc durant les primeres 24h, tot acabant de produir-se durant les següents setmanes. La causa d'aquest increment de la ventilació és un canvi químic en el control de la respiració, que permetrà mantenir la pressió d'O₂ alveolar enfront de la reduïda pressió d'O₂ inspirada (West et al., 2007). Aquest procés és difícil de mantenir molt de temps ja que, una de les seves principals conseqüències a causa de la pèrdua de CO₂, és l'important alcalosis respiratòria que es produeix tot afavorint l'afinitat de l'O₂ per part de l'Hb (West, 1990). Aquest fet va acompanyat d'una vasodilatació perifèrica per tal d'augmentar el volum sanguini que arriba als teixits i d'una vasoconstricció alveolar per tal d'augmentar el temps en què la sang s'oxigena als pulmons. A curt termini s'augmenta el subministrament d'O₂ però, a mig termini ja pot provocar problemes greus com l'aparició d'hipertensió pulmonar i fins i tot la formació d'edemes.

Cardiovasculars: també succeeixen canvis importants en el sistema cardiovascular de l'individu quan és sotmès a gran altura. La despesa cardíaca augmenta, com també ho fa el flux d'Hb degut a la policitèmia. L'augment de la despesa cardíaca fa que sigui complicat mantenir la també augmentada freqüència cardíaca que apareix en estadis primerencs de l'exposició (West et al., 2007). En estadis més avançats, es produeix una disminució d'aquesta freqüència cardíaca ja que augmenta el volum sistòlic. A molt més llarg termini, s'observarà un augment del nombre i de l'obertura dels capil·lars sanguinis, una disminució de la distància de difusió de l'O₂ en les fibres i una disminució de les resistències vasculars musculars o perifèriques (León-Velarde, 1993; Panisello et al., 2007).

Hematològics: degut a l'estimulació de la secreció de l'hormona eritropoetina (EPO), s'observa una major disponibilitat d'eritròcits en sang (Siqués et al., 2006; Casas et al., 2000a). Aquest fenomen permet un augment de la concentració d'Hb en el torrent sanguini, fet que afavorirà l'increment de transport d'O₂ a mig termini. L'augment d'eritròcits en plasma afectarà a la viscositat de la sang d'una forma determinada. Diversos estudis confirmen que aquest augment d'eritròcits produeix un increment significatiu de la viscositat (Guyton et al., 1973). Segons els estudis realitzats en el nostre laboratori (Viscor et al. 2000; Esteva et al., 2009), els valors de la viscositat no es veieren incrementats significativament, fet que afavoriria la circulació sanguínia i el conseqüent transport d'O₂. L'augment inicial de la concentració d'Hb durant els primers dies i setmanes d'exposició hipòxica, es veu fortament influenciat per una reducció del volum plasmàtic. Aquest fet tindrà lloc, aproximadament, fins la sisena setmana d'aclimatació. A partir d'aquí, la massa eritrocitària continuarà incrementant però no succeirà el mateix amb la concentració d'Hb, la qual es mantindrà constant ja que el volum plasmàtic deixarà de minvar (West et al., 2007).

Cel·lulars i metabòlics: s'ha observat en altitud extrema una reducció en l'activitat de certs enzims (Cerretelli, 1987; Howald et al., 1990). Tot i això, hi ha evidències que la hipòxia causada per moderada o alta altitud incrementa la concentració i/o l'activitat de diversos enzims importants involucrats en el metabolisme oxidatiu (sembla ser que la hipòxia no afectaria enzims involucrats en rutes glicolítiques) (West, et al., 2007). Pel que fa al volum mitocondrial, els resultats són dispars depenent de si els subjectes experimentals són animals o humans i de la intensitat d'exposició (Hoppeler et al., 2003). Per tal de millorar l'oxidació a llarg termini, s'observa un augment en el nombre de mitocòndries a moderada alçada (Ou & Tenney, 1970) i, per contra, en altitud extrema s'aprecia una disminució en el volum mitocondrial (Hoppeler et al., 1990). S'esdevé també un canvi en el metabolisme energètic, fet que comporta que el quocient respiratori RQ s'aproximi a 1 (disminució de la utilització de lípids i augment de l'ús dels carbohidrats). Tal com hem comentat en apartats anteriors, és important fer

esment dels canvis que es produeixen en molècules que intervenen en diverses cascades de senyalització depenents de HIF, tal com serien la del VEGF (*vascular endothelial growth factor*) i EPO.

1.5. Material biològic estudiat

Les mostres estudiades foren la sang i els músculs miocardi (MC), diafragma (DG), *Tibialis anterior* (TA), *Extensor digitorum longus* (EDL) i *Soleus* (SOL). D'aquesta manera es pogueren estudiar diversos tipus de mostres amb diferents característiques funcionals, activitat i composició de teixits. Això va permetre tenir una visió més amplia dels efectes de la hipòxia en els animals estudiats.

1.5.1. Hematologia

Uns dels aspectes més coneguts que ocorren durant l'aclimatació a l'altitud és l'augment del nombre d'eritròcits per unitat de volum i, consegüentment, un increment de la concentració d'Hb (León-Velarde et al., 2000; Rodriguez et al., 1999). Paul Bert, en el llibre *La Pression Barométrique* de 1878, ja va suggerir aquest fet pel qual la sang és capaç de transportar més O₂. Actualment sabem que aquest augment succeeix de forma relativament ràpida en exposicions a l'altitud i que també estaria influenciat per la reducció del volum del plasma (Heinicke et al., 2003).

L'increment en el nombre de glòbuls vermells i en la concentració d'Hb augmenta la capacitat de transport d'O₂ de tal manera que, a 5.300m, humans plenament aclimatats tenen el mateix contingut d'O₂ en sang que a nivell del mar. Aquest increment de capacitat de transport compensa una saturació d'O₂ reduïda (Ricart et al., 2005).

Un increment del nombre d'eritròcits podria comportar un augment dels valors de la viscositat de la sang. Pel fet que la sang es comporta com un fluid

no-newtonià, no se li pot assignar un únic valor de viscositat. Aquest valor variarà d'acord amb la forma amb la qual és mesurat *in vitro*. En l'apartat 1.6. d'aquesta introducció, parlarem d'una forma més detallada del comportament reològic de la sang, és a dir, de les seves qualitats físiques durant el flux i on la viscositat hi té el paper més important.

Regulació de la concentració d'Hb:

La concentració d'Hb i del PCV (*cell packed volume*, paràmetre assimilat a l'hematòcrit, Hc) depenen del *ratio* entre la massa eritrocítica i el volum plasmàtic. Aquesta taxa de formació de glòbuls rojos (l'anomenada eritropoesi) i la seva taxa de pèrdua, determinarà la mencionada massa eritrocítica.

Els glòbuls vermells es perden o bé per mort (tenen una vida d'aproximadament 120 dies) o bé per hemorràgia. La seva mort pot ser accelerada per una gran varietat d'estats patològics, tal com podria ser l'anèmia hemolítica. L'eritropoesi es pot veure deteriorada per diverses deficiències, com la de ferro o Vitamina B₁₂ (necessàries per a la síntesi d'Hb), i/o també per desordres a nivell de la medulla òssia. En absència de deficiències i desordres, l'eritropoesi és controlada pels nivells de l'hormona de l'eritropoetina. L'EPO es produeix principalment al ronyó i un 10-15% al fetge. Els dos clàssics estímuls per a la secreció d'EPO són l'efecte de la hipòxia i la pèrdua de sang. Aquest últim és, probablement, el més important dels dos en termes d'evolució de la subsistència de l'organisme.

Altitud i paràmetres hematològics:

El resultat d'un increment d'eritropoesi en altura, comporta un augment de la massa d'eritrocits degut a la invariabilitat de la vida efectiva d'aquests (Berlin et al., 1954). En la Fig. 3, es mostra la situació de diversos paràmetres sanguinis a diferents altures (Pugh, 1964a). Podríem destacar la notable disminució del volum plasmàtic i l'augment de la massa eritrocitària que es produeix.

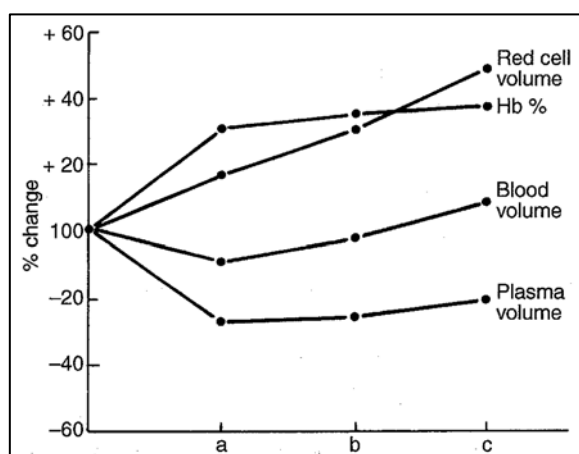


Fig. 3. Canvis en el volum de glòbuls rojos, Hb (%), volum de sang i volum de plasma, en quatre subjectes durant la Silver Hut Expedition: (a) després de 18 setmanes entre 4000 i 5800m; (b) després de 3-6 setmanes a 5800m; (c) després de 9-14 setmanes a 5800m o més (Pugh, 1964b).

L'excessiu augment de concentració d'Hb (per damunt de $22\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$), es considera generalment una patologia amb un diagnòstic de mal crònic de muntanya. Les persones natives d'altres altures i habitants de cotes baixes residents a altes altures durant diversos anys, estan sota risc de desenvolupar aquesta malaltia policitèmica. Segons els estudis realitzats per Huang i col·laboradors (1984), els xinesos de Han provinents de cotes baixes i residents al *plateau* tibetà, tenen una incidència major d'aquesta policitèmia que els propis tibetans.

1.5.2. Miocardi

El cor (anomenat també miocardi) és el principal òrgan del sistema circulatori i està situat a la meitat esquerra de la caixa toràcica i sobre el diafragma. Per al present estudi, utilitzarem els ventricles drets de cada un dels animals experimentals per dur a terme les anàlisis bioquímiques corresponents. Aquest múscul consta histològicament de 4 capes: pericardi (sac membranós que embolcalla el cor); epicardi (capa externa serosa en contacte amb el pericardi on hi trobem capil·lars i fibres nervioses); miocardi (múscul cardíac

encarregat d'impulsar la sang arreu del cos mitjançant la seva contracció i, està format per teixit connectiu, capil·lars sanguinis i limfàtics i fibres nervioses); i endocardi (capa interna serosa de teixit connectiu en contacte amb la sang). Les *working myocardial cells* són les cèl·lules més típiques del miocardi. Aquestes cèl·lules (també anomenades fibres musculars) presenten un contingut ric en miofibril·les i discs intercalars ben desenvolupats. També es caracteritzen per ser totes iguals des del punt de vista histològic (Scheuermann, 1993). És un teixit completament aeròbic, amb una gran capacitat oxidativa. És un múscul que està actiu constitutivament i, per tant, la seva activitat és alta. És per això que és un múscul útil per l'estudi de les variacions d'una musculatura activada de manera contínua i amb totes les fibres del mateix tipus metabòlic.

1.5.3. Diafragma

El diafragma és una fina porció de múscul esquelètic amb una forma essencialment de cilindre el·líptic (Roussos, 1985). Aquest òrgan separa la cavitat toràcica de l'abdominal, és el principal responsable de la inspiració i és considerat el múscul ventilatori més important en els mamífers (i en algunes aus). És un múscul activat de forma constitutiva i està format per tres tipus de fibres metabòlicament i histològica diferents: SO (*Slow oxidative*), FOG (*Fast oxidative glycolytic*) i FG (*Fast glycolytic*). Les fibres musculars del diafragma acostumen a diferenciar-se en tres parts segons el seu origen: part externa, part lumbar i part costal. La part costal del diafragma fou l'estudiada en aquest treball, la qual s'insereix a les capes internes dels cartílags i a les porcions adjacents de les últimes 6 costelles inferiors situades a cada costat. Aquestes, a la vegada, estan en contacte amb el múscul *Transversus abdominis*. La major part d'aquestes fibres s'orientaran radialment en sentit longitudinal de dalt cap a baix (Whitelaw, 1987).

1.5.4. Tibialis anterior

Múscul esquelètic locomotor ubicat en les extremitats inferiors i localitzat sota el bíceps femoris i sobre l'EDL. És definit com un múscul de contracció ràpida i només és actiu durant la locomoció quan es dorsiflecciona el turmell. És un múscul compost de diferents tipus de fibres musculars, tot i que la proporció varia depenent de l'àrea analitzada. En el nostre model experimental, aquesta és una musculatura amb poca activitat ja que els animals estaven ubicats en un lloc tancat (gàbies) amb la impossibilitat de realitzar un exercici de forma regular.

1.5.5. Extensor digitorum longus

És un múscul de contracció ràpida, situat a les dues extremitats posteriors de l'animal i intervé en processos d'activitat ràpida i d'alta intensitat. Per tant, el seu metabolisme és essencialment glicolític (Close, 1972). Té una composició fibril·lar mixta i està format principalment per fibres FG (50% o més) (Faucher et al., 2005).

1.5.6. Soleus

Múscul postural de contracció lenta amb un marcat caràcter oxidatiu (Close, 1972). Es troba localitzat a les dues extremitats posteriors de l'animal i és molt homogeni en la seva composició, ja que un 80% de les seves fibres són SO (Faucher et al., 2005).

Múscul	Característica principal	Activitat	Metabolisme	Fibres
MC	Cardíac	Alta (constitutiú)	Oxidatiu	Oxidatives
DG	Respiratori	Alta (constitutiú)	Oxidatiu-No Oxidatiu	SO, FOG, FG
TA	Locomotor (extremitats)	Baixa (sedentari)	Oxidatiu-No Oxidatiu	SO, FOG, FG
EDL	Locomotor, activitats ràpides (extremitats)	Alta (no-constitutiú)	Glicolític	FG (50%)
SOL	Postural	Baixa (sedentari)	Oxidatiu	SO (80%)

Fig. 04 . Tipus de músculs amb les seves característiques més importants (**SO**: *Slow Oxidative*; **FOG**: *Fast Oxidative Glycolytic*; **FG**: *Fast Glycolytic*).

1.5.7. Tipus de musculatura- Fibres musculars

Els músculs es classifiquen principalment, tant des d'un punt de vista morfològic com funcional, en múscul llis i múscul estriat. A la vegada, podem dividir el múscul estriat en múscul esquelètic i cardíac. Tot i que el mecanisme de contracció d'aquests dos músculs és quasi idèntic, trobem una clara diferència en la seva organització cel·lular. En el present treball, DG, TA, EDL i SOL presentarien una musculatura esquelètica, i el MC la cardíaca.

A) Musculatura esquelètica- Estructura de la musculatura.

El múscul esquelètic és l'encarregat del moviment de certes parts dels animals, ja que cada un dels seus extrems resta unit a un os o a alguna altra estructura. Quan el múscul s'escurça, la relació física entre els dos punts d'ancoratge es veu sotmesa a un canvi. Normalment aquesta unió a la massa òssia es duu a terme per una resistent banda de teixit connectiu, els tendons. Aquesta musculatura és controlada de forma voluntària pel SNC i presenta

una disposició de jerarquia estereotipada de les diverses estructures que la constitueixen. Aquests músculs estan formats per fibres paral·leles multinucleades que, a la vegada, contenen diverses miofibril·les. Cada una de les fibres musculars deriva embrionàriament d'un grup de mioblasts, els quals es fusionen formant miotubs. El miotub és el responsable de sintetitzar les proteïnes característiques de les fibres musculars tot diferenciant-se fins a adquirir la forma adulta. Les miofibril·les estan formades per sarcòmers que contenen filaments primis d'actina i uns de més gruixuts de miosina intercalats entre ells. Els filaments d'actina estan ancorats a les regions denominades discs Z (Randall et al., 1998) (Vegi's Fig. 5).

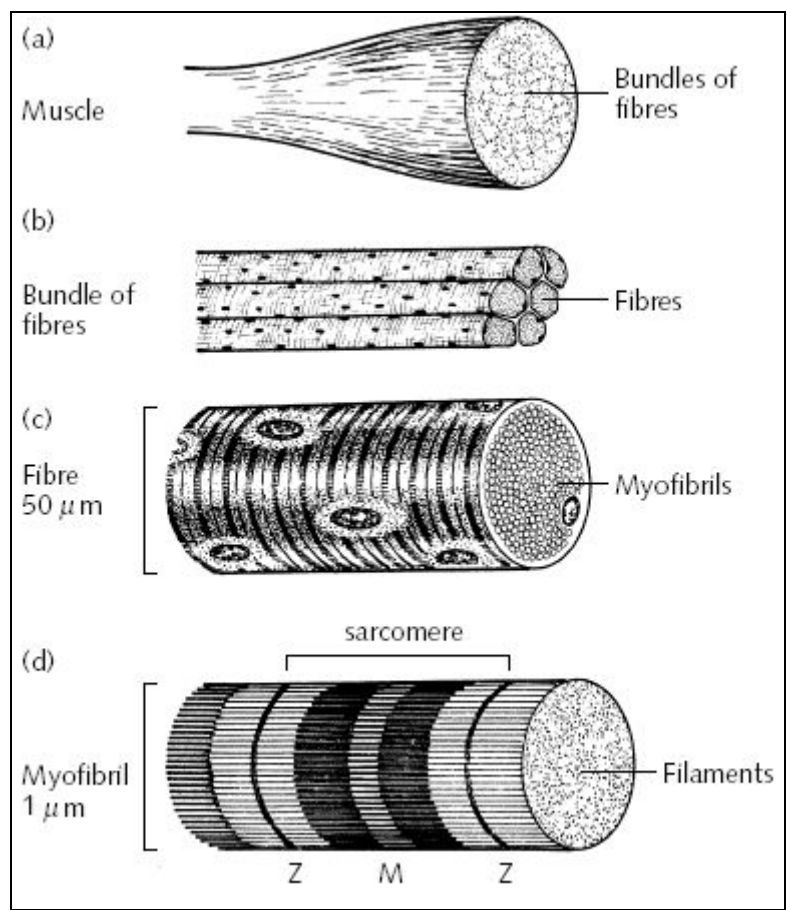


Fig. 5. Organització jeràrquica del múscul esquelètic.

B) Musculatura cardíaca

La musculatura cardíaca la trobem localitzada únicament al cor i s'encarrega de la contracció del miocardi. Aquest tipus de múscul comparteix moltes característiques amb el múscul esquelètic tot i diferir en alguns aspectes importants: les fibres musculars cardíques estan innervades per nervis autònoms; la innervació actua només de forma moduladora sense produir potencials postsinàptics discrets; presenta contraccions espontànies miogèniques originades per la regió marcapassos del cor; presenta una velocitat de contracció més lenta que la musculatura esquelètica; i les cèl·lules musculars cardíques (miòcits) contenen un únic nucli i estan interconnectades elèctricament entre sí, per tal que el potencial d'acció es propagui ràpidament d'una a l'altra amb l'objectiu que el conjunt del múscul es contragui com una sola unitat.

Tipus de fibres musculars

Els músculs esquelètics dels vertebrats estan compostos per més d'un tipus de fibres (Rome et al., 1988). Certs músculs contenen una gran proporció de fibres tòniques especialitzades en la contracció lenta y contínua (útils per mantenir un to postural). D'altres, presenten un percentatge de fibres fàsiques especialitzades en moviments ràpids (com els de les extremitats). Aquestes diferents classes de fibres musculars poden diferenciar-se en base a criteris bioquímics, metabòlics o histoquímics. Les fibres musculars tòniques es contrauen molt lentament, no produeixen contraccions fàsiques i normalment no produeixen potencial d'acció (no precisen d'aquest potencial per propagar l'excitació ja que ho fan les branques del nervi motor, que recorren la fibra muscular realitzant repetides sinapsis al llarg de tota la seva longitud). Aquestes fibres es troben principalment en músculs posturals d'amfibis, rèptils i aus (Randall et al., 1998) . És per aquest fet, que en el nostre treball estudiarem els tipus de fibres fàsiques, localitzades en mamífers.

Basant-nos en l'activitat de diferents enzims a partir de determinacions bioquímiques (Peter et al., 1972), les fibres fàsiques dels músculs esquelètics dels mamífers es classifiquen en tres diferents grups: SO (*Slow Oxidative*), FOG (*Fast Oxidative Glycolytic*) i FG (*Fast Glycolytic*) (Vegi's Fig. 6). Malgrat ser una simplificació "acadèmica" de la realitat muscular, aquesta nomenclatura ha estat àmpliament acceptada pels fisiòlegs ja que atribueix certes característiques metabòliques a cada tipus de fibra. Posteriorment, s'ha demostrat que aquestes característiques estan relacionades amb les propietats fisiològiques de les diferents unitats motores.

Propietats	SO/I	FOG/IIb	FG/IIa
Velocitat de contracció ($V_{m\grave{a}x}$)	Lenta	Ràpida	Ràpida
Activitat ATPasa de la miosina	Baixa	Alta	Alta
Resistència a la fatiga	Alta	Intermèdia	Baixa
Fosforilació oxidativa	Alta	Alta	Baixa
Enzims per la glucòlisi anaeròbica	Baixa	Intermèdia	Alta
Nombre de mitocòndries	Moltes	Moltes	Poques
Diàmetre de la fibra	Petit	Intermedi	Gran
Força per àrea de la secció transversal	Baixa	Intermèdia	Alta

Fig. 6. Propietats de les fibres fàsiques en els músculs esquelètics dels mamífers. (Sherwood, 1993; Randall et al., 1998).

1.6. La reologia

La reologia és la part de la física que estudia la relació entre l'esforç i la deformació de la matèria incloent-hi els materials que són capaços de fluir. I la hemoreologia és la part de la biofísica que estudia les propietats reològiques de la sang, dels seus components i dels vasos sanguinis (Scott-Blair, 1969; Dintenfass, 1971). L'instrument que utilitzarem per estudiar la reologia de la sang s'anomena reòmetre, el qual ens permetrà estudiar com aquest fluid biològic flueix quan se li apliquen una sèrie de forces externes (Vegi's Annex 2).

1.6.1. Principis bàsics de la reologia dels líquids

Considerarem un líquid dividit en estrats paral·lels i infinitesimals, de superfície A i sotmès a una força tangencial F en la seva capa superior (Vegi's Fig. 7). Si no existís un fregament entre les capes, totes es desplaçarien a una igual velocitat "u" sense entrecreuar-se entre sí. Quan es dóna aquesta situació, es diu que el flux és laminar, de forma que es produeix un lliscament entre els estrats. Si el fluid és viscos, les molècules en contacte amb la paret (capa inferior) s'adhereixen a aquesta i les capes pròximes resulten frenades a causa del fregament intern del fluid. Llavors la velocitat augmenta des de la capa inferior fins a la superior de forma que, unes capes llisquen damunt d'unes altres de la mateixa manera que ho fan les fulles d'un llibre que reposen sobre una taula quan hi apliquem una força horitzontal a la coberta superior (capa superior).

La força tangencial aplicada per unitat de superfície es coneix com la tensió tangencial o esforç tallant (*shear-stress*) i és representada per la τ ($\tau = F/A = \text{dines}\cdot\text{cm}^{-2}$). L'efecte deformant mitjançant el qual s'aconsegueix el flux d'un líquid al aplicar-li una tensió tangencial es coneix com a cisallament (*shear*). El quocient entre la velocitat i la distància de capes contigües del líquid (du/dx) és denominat gradient de velocitat (*shear-rate*) i és representat per una $\dot{\gamma}$ ($\dot{\gamma} = du/dx = \text{s}^{-1}$). La relació entre la tensió tangencial i el gradient de velocitat es coneix amb el nom de viscositat o coeficient de viscositat del fluid, i es representa amb el símbol η ($\eta = \tau / \dot{\gamma} = \text{dines}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-2}$ (poise)). La viscositat representa la resistència, per fricció, que els estrats infinitesimals del líquid ofereixen al flux.

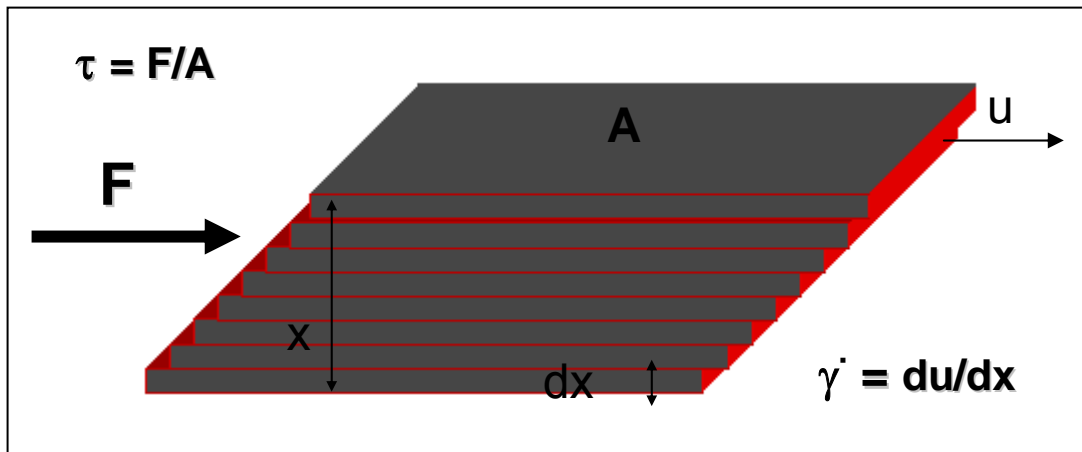


Fig. 7. Representació gràfica dels paràmetres que intervenen en la viscositat sanguínia.

1.6.2. Líquids newtonians

Són aquells fluids la viscositat dels quals es pot considerar constant en el temps. A mesura que augmenta la tensió tangencial aplicada, el gradient de velocitat varia de forma proporcional, de tal forma que la relació entre ambdós, la viscositat, és constant (Vegi's Fig. 8). Aquests fluids s'anomenen líquids newtonians o de viscositat pura, són de pes molecular baix i no contenen partícules suspeses. Pel fet de ser els fluids estudiats per Isaac Newton, en termes de fluïdesa i viscositat, són caracteritzats com a fluids newtonians.

La relació $\tau / \gamma' = \eta$ constitueix la Llei de la viscositat de Newton, la qual implica que la viscositat d'un líquid serà la mateixa per a qualsevol valor de τ o γ' i, per tant, queda caracteritzat reològicament amb un únic valor de viscositat per a una temperatura donada. Per definició, la viscositat d'un fluid newtonià no dependrà de les forces exercides sobre ell, sinó que estarà influenciada per la temperatura, la pressió i pels components químics del fluid si aquest no és una substància pura. A mesura que augmenta la temperatura

d'un fluid disminueix la seva viscositat, això indica que la viscositat actua de forma inversament proporcional a l'efecte de la temperatura.

La fricció d'un flux unidimensional d'un fluid newtonià s'expressa mitjançant la següent relació matemàtica: $\tau = \mu \cdot (dv/dx)$. τ és la tensió tangencial que s'exerceix en un punt concret del fluid (Pa) i μ és la viscositat del fluid (Pa·s). El gradient de velocitat (dv/dx) és perpendicular a la direcció del pla en el qual es calcula la tensió tangencial (s^{-1}).

Un fluid newtonià, com l'aigua, seguirà fluint malgrat que les forces externes continuïn actuant sobre ell, independentment de la velocitat a la qual sigui remogut o mesclat. Un bon nombre de fluids comuns es comporten com a fluids newtonians sota condicions normals de pressió i temperatura: l'aire, l'aigua, la gasolina i alguns olis minerals.

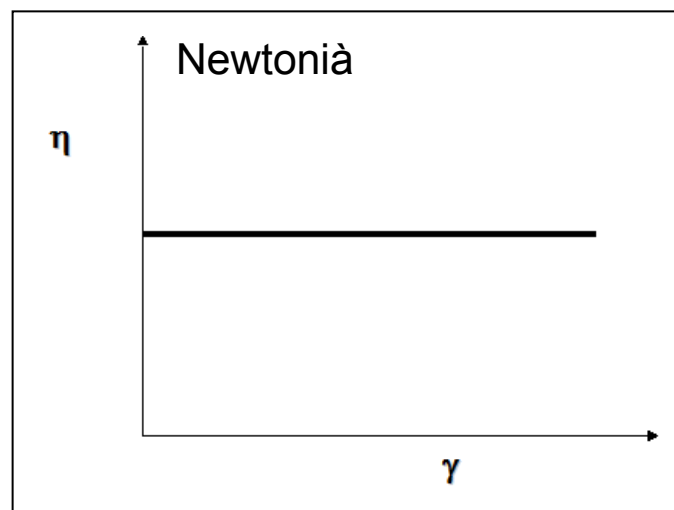


Fig. 8. Comportament reològic d'un líquid newtonià.

1.6.3. Líquids no-newtonians

Es demostrà que fluids biològics com podrien ser la sang o el mucus, tenen característiques de fluïdesa anòmales i no es comporten com una substància

newtoniana. Aquests fluids contenen macromolècules dissoltes en ells (en el cas del fluid sanguini l'exemple clar són, principalment, els eritròcits suspesos en el plasma). També trobem aquestes característiques no-newtonianes reflectides en diversos fluids fora del camp de la biologia, tal com les pintures, tintes, ketchup, shampoo, etc. Tots aquests fluids, per tant, s'anomenaran usualment no-newtonians. Per determinar la viscositat d'un fluid amb propietats de flux anòmales és necessari fer servir un instrument en el qual tot el fluid estigui exposat a una força tangencial i a un gradient de velocitat uniforme. Cadascun d'aquests efectes podrà ser determinat per separat utilitzant el ja anomenat reòmetre.

Els líquids no-newtonians són aquells que no compleixen la Llei de Newton quan flueixen en un règim laminar, és a dir, la raó entre la tensió tangencial i el gradient de velocitat ($\tau/\dot{\gamma}$) no és constant. Donat que no posseeixen una viscositat característica, s'utilitzen reogrames i paràmetres derivats d'ells per definir-los.

Un reograma és la representació gràfica de la funció entre τ i $\dot{\gamma}$ o de la funció d' η enfront de $\dot{\gamma}$, entre d'altres. D'aquestes funcions s'extreuen determinats paràmetres reològics. Existeixen, per tant, dos models principals de reogrames: corbes de viscositat (η enfront de $\dot{\gamma}$) i corbes de fluïdesa (τ enfront de $\dot{\gamma}$). Els reogrames basats en les corbes de viscositat seran els que utilitzarem en aquest treball. La viscositat aparent (η_a) es defineix com la raó $\tau/\dot{\gamma}$ per a un determinat valor de $\dot{\gamma}$. Com pot observar-se a la Fig. 9 pot determinar-se η_a per a $\dot{\gamma}_1$ a partir de l'angle α que forma la recta que passa per l'origen de coordenades i el valor de la funció per a τ_1 ($\eta_a = 1 / \text{tg } \alpha = \tau_1 / \dot{\gamma}_1$). Si considerem l'angle α' (format per la tangent a la funció per a $\dot{\gamma}_1$ i l'eix d'ordenades), podem definir la viscositat diferencial (η') com a: $\eta' = 1 / \text{tg } \alpha' =$

$\tau_1 / \dot{\gamma}_1$. Aleshores podem afirmar, que la viscositat diferencial equival al pendent de la recta tangent a la funció $\tau = f(\dot{\gamma})$ en el punt $(\tau_1, \dot{\gamma}_1)$.

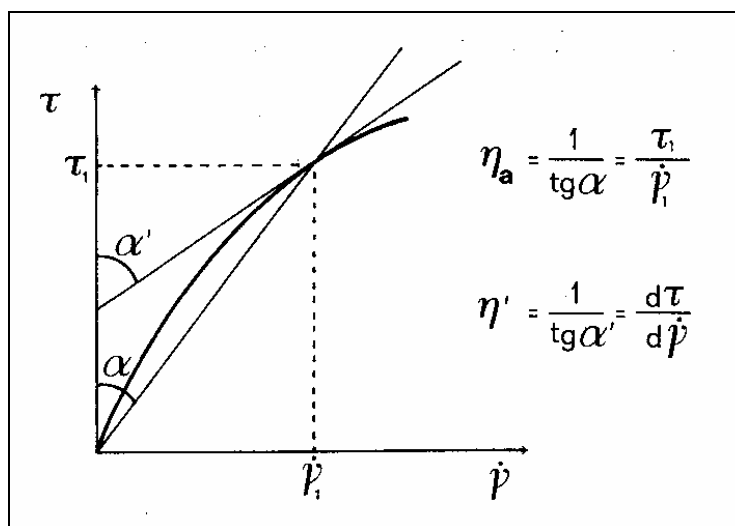


Fig. 9. Reograma de fluïdesa d'un líquid no-newtonià i definició de viscositat aparent (η_a) i viscositat diferencial (η').

1.6.4. Comportament reològic de la sang

El comportament reològic sanguini respon a un model no-newtonià del tipus pseudoplàstic (Prothero & Burton, 1961). Aquest comportament pseudoplàstic (*shear-thinning*) implica que la seva viscositat aparent disminueix quan augmenta $\dot{\gamma}$. A més a més, a baixos gradients de velocitat, la sang presenta tixotropia (Huang et al., 1975), on es pot observar un canvi en la seva viscositat dependent del temps. A major esforç de cisallament sobre el fluid, menor viscositat. Aquest fluid trigarà un temps finit a aconseguir una viscositat d'equilibri quan hi ha un canvi instantani en el ritme de cisallament (Vegi's Fig. 10 i 11). Quan s'estudia el comportament reològic de la sang amb viscosímetres capaços de mesurar en condicions de flux oscil·lant, s'observa que també respon a un model viscoelàstic (Thurston, 1972). Aquest tipus de fluids, a més a més de posseir un comportament viscos, presenten a la vegada un comportament elàstic. Quan apliquem una tensió sobre aquest fluid, el component elàstic absorbeix una part de l'energia a la qual està sent

sotmès i l'emmagatzema en forma d'energia potencial durant la deformació. També aprofita aquesta energia per retornar a l'estat inicial de no deformació quan la tensió cessa. El component viscos absorbix la resta d'energia transformant-la en energia cinètica i dissipant-ne una part en forma de calor degut a la fricció interna.

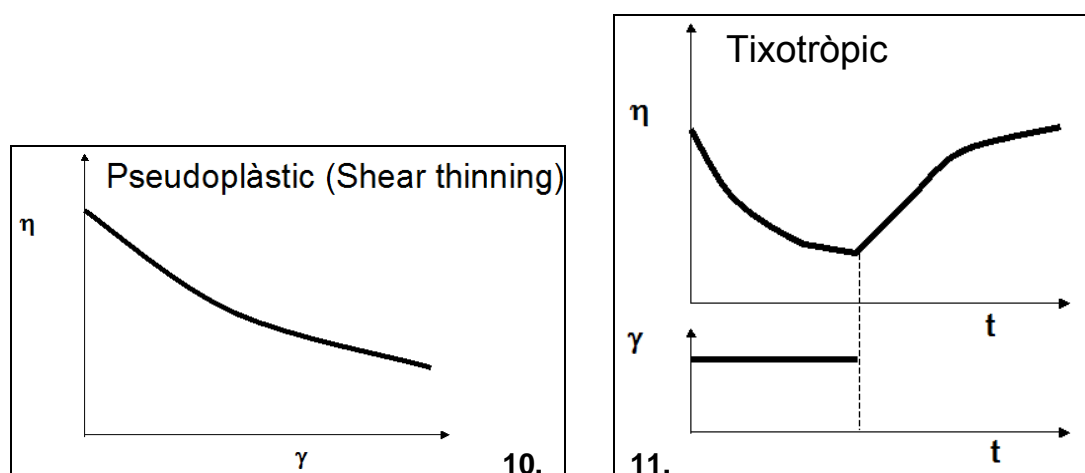


Fig. 10 i 11. Reogrames explicatius del comportament sanguini pseudoplàstic i tixotròpic.

Degut al comportament no-newtonià de la sang, diversos efectes remarcables estaran implicats i influiran en l'hemodinàmica de l'animal. Al llarg de tot el trànsit pel sistema vascular, la sang es veurà sotmesa a diverses condicions de gradients de velocitat, fluxos laminars i turbulents, i a unes condicions de flux oscil·lant amb major o menor força i intensitat segons el tram d'arbre vascular que considerem. Per tant, certs factors hemoreològics no vasculars i vasculars incidiran de forma directa sobre aquest comportament hemodinàmic de la sang.

1.6.4.1. Factors hemoreològics no vasculars:

Aquests factors incideixen d'una forma directa sobre el complex comportament reològic de la sang i actuen de forma concomitant i simultània per a un gradient de velocitat determinat. Podem dividir els factors

hemoreològics no vasculars en macroreològics (temperatura, viscositat plasmàtica i Hc) i microreològics (deformació i agregació dels eritròcits) (Chien et al., 1971). L'efecte de les plaquetes i dels leucòcits es considera poc rellevant degut a la seva menor incidència i menor nombre relatiu (Merrill et al., 1969).

Macroreològics:

a) Temperatura: la temperatura és una factor que afecta a la viscositat de tot fluid. Actua de forma inversament proporcional en els líquids: a major temperatura s'observa una menor viscositat.

b) Viscositat plasmàtica: la viscositat de la part líquida de la sang depèn fonamentalment de la seva concentració en macromolècules. Les proteïnes plasmàtiques són les macromolècules localitzades en el plasma en condicions fisiològiques i juguen un important paper. Tot i que el fibrinogen n'és una de les que més influirà en la viscositat del plasma, les γ -globulines, lipoproteïnes i albúmines també jugaran un paper destacat (Merrill et al.,

1963; Matsuda & Murakami, 1976). El mecanisme mitjançant el qual les proteïnes originen un augment de la viscositat del plasma, són les pertorbacions hidrodinàmiques provocades per les molècules proteiques sobre les línies de flux del plasma. La viscositat del plasma afecta de forma directa a la viscositat de la sang ja que aquesta, es considera com una suspensió de partícules en el plasma. Al mateix temps però, els components del plasma també poden afectar a les cèl·lules sanguínies causant variacions en el comportament reològic d'aquestes i, en últim terme, modificant les característiques reològiques de la sang total.

c) Hematòcrit: Trevan (1918) ja va demostrar la relació entre l'Hc i el volum corpuscular enfront la viscositat de la sang. Chien i col·laboradors (1970) demostraren de forma fisicomatemàtica la influencia de l'Hc sobre la

viscositat aparent sanguínia. Segons aquests estudis realitzats per Chien i col·laboradors (1970), els eritròcits produeixen una alteració hidrodinàmica sobre les línies de flux del plasma, fet que produeix una major viscositat aparent degut a la suspensió de cèl·lules contingudes en el plasma. Tenint presents les pertorbacions que produeixen els eritròcits sobre aquestes línies de flux, al volum ocupat per un eritròcit se li hauria de sumar el que ocupa el plasma que es comporta hidrodinàmicament com una extensió rígida d'aquestes cèl·lules. Per tant, una part del plasma es troba associada a la superfície dels eritròcits tot produint que l'Hc real es vegi augmentat per un Hc virtual, originant així un Hc aparent.

Microreològics:

Els factors microreològics són l'estat de deformació i l'estat d'agregació dels eritròcits (Vegi's Fig. 12). Aquests fenòmens són dependents de la cisalla que s'hi aplica i els podem considerar com els factors responsables del comportament estructural, tixotròpic i viscoelàstic de la sang. Els mecanismes que regulen la **deformació** dels eritròcits en els mamífers, han estat àmpliament estudiats en humans (Rand & Burton, 1964), així com també el seu paper en la viscositat sanguínia (Chien et al., 1970). Els factors que afecten i/o regulen l'estat de deformació dels eritròcits dels mamífers són fonamentalment els següents:

a) Tensió tangencial: la tensió tangencial sotmesa a la cèl·lula per part del plasma, que a la vegada, depèn de dos factors: la viscositat plasmàtica i gradient de velocitat.

b) Hc: en funció de la concentració de cèl·lules en sang, s'observa el nivell d'interacció entre elles. Aquest fet provocarà fenòmens d'alineament o apilotonament cel·lular que comportaran diversos graus de deformació.

c) pH del plasma: afecta a la forma i a la capacitat de deformació dels hematies.

d) Tensió d'O₂ en el medi: aquesta tensió modifica l'estat fisicoquímic del contingut cel·lular (Hb), tot afectant la viscositat interna de l'eritròcit i les seves propietats reològiques.

e) Deformabilitat intrínseca de l'eritròcit: és resultant de la suma de diversos factors, l'elasticitat de la membrana cel·lular, la viscositat interna de l'eritròcit, l'estat metabòlic de la cèl·lula i l'estat fisicoquímic de l'Hb.

En el cas del eritròcits dels vertebrats no mamífers, hauríem d'afegir-hi dos factors addicionals: la presència del nucli cel·lular (Chien et al., 1971) i l'existència d'un sistema citoesquelètic d'ancoratge a la membrana cel·lular "*marginal band*" (Sloboda & Dickersin, 1980), que impedeix el moviment independent de la membrana cel·lular respecte al citosol.

Els factors que afecten a l'**agregació** eritrocitària són diversos i han estat descrits per diversos autors (Rovel et al., 1979; Fukada & Kaibara, 1980). En condicions fisiològiques, podem destacar-ne els següents:

a) El gradient de velocitat aparent: aquest gradient produeix dos efectes simultanis: la formació d'agregats cel·lulars per col·lisió de dues cèl·lules que es mantenen en contacte durant un temps suficient per permetre l'agregació; i la destrucció d'agregats, per l'acció de forces de fricció del plasma sobre les cèl·lules agregades. Trobem per tant un equilibri dinàmic, per a un determinat gradient de velocitat, entre l'associació i la dissociació reversible dels agregats d'hematies.

b) Les propietats fisicoquímiques del plasma (o del medi de suspensió): en aquest punt destaquen les concentracions iòniques i macromoleculares, és a dir, molècules que juguen un paper molt important en la formació d'agregats a través de mecanismes de força iònica o mitjançant la formació d'enllaços dèbils entre proteïnes plasmàtiques i proteïnes de la membrana eritrocitària (el fibrinogen presenta un paper fonamental en aquest procés).

c) L'Hc: aquest influeix sobre el grau d'agregació dels eritròcits mitjançant la freqüència de col·lisions (ψ). A uns valors baixos d'Hc, ψ tendirà a zero, mentre que per valors d'Hc molt alts, ψ serà molt elevada i això permetrà la formació d'agregats.

d) L'agregabilitat intrínseca dels eritròcits: dependrà de tots aquells factors que controlen la deformabilitat eritrocitària i de l'afinitat de la membrana de l'eritròcit per l'adsorció de proteïnes plasmàtiques, les quals són necessàries per establir els ponts d'unió entre cèl·lules en contacte.

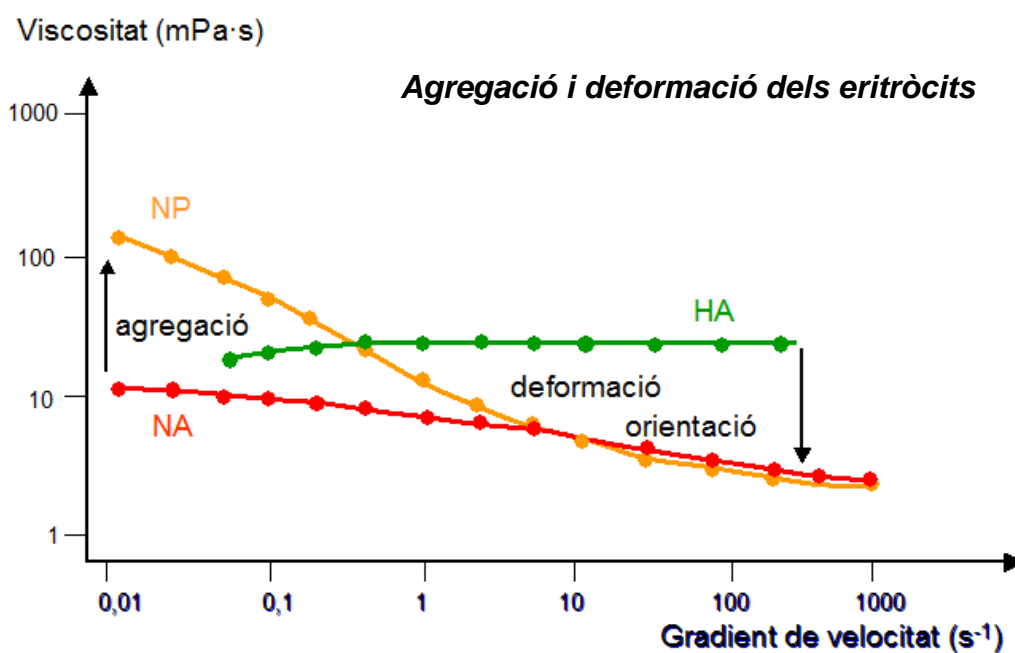


Fig. 12. Esquema il·lustratiu de com l'agregació i la deformació dels eritròcits, condicionen la viscositat de la sang (**A**: en solució Ringer-Albúmina; **P**: en plasma; **N**: eritròcits normals; **H**: eritròcits fixats en glutaraldehid).

1.6.4.2. Factors hemoreològics vasculars:

La circulació de la sang a través de l'arbre vascular pot classificar-se, des d'un punt de vista reològic, en tres gran etapes en funció del diàmetre (r) del vas respecte a les dimensions de l'eritròcit (D):

a) La microcirculació ($50 \geq r/D \geq 1$) a les arterioles i vènules. En aquest tram es manifesta el seu característic comportament no-newtonià de tipus pseudoplàstic.

b) Circulació capil·lar ($r/D \leq 1$). Succeeix en els capil·lars i és on s'aconsegueixen uns gradients de velocitat més elevats i on les propietats reològiques intrínseques de l'eritròcit adquireixen una major importància.

c) Gran circulació ($r/D \geq 50$). Succeeix a les grans artèries i venes. Les qualitats reològiques de les parets dels vasos juguen un paper important així com les propietats d'agregabilitat eritrocitària i les propietats viscoelàstiques i tixotròpiques de la sang.

A la circulació capil·lar i microcirculació existeixen una sèrie de factors que influeixen de forma notable sobre el comportament reològic de la sang:

a) Efecte Fåhræus-Lindqvist: consisteix en una disminució de la viscositat aparent de la sang en capil·lars de diàmetre inferior a un valor crític ($\approx 300 \mu\text{m}$ en humans) (Fåhræus & Lindqvist, 1931).

b) Efecte Fåhræus : té lloc degut a la disminució de l' H_c a l'interior d'un vas capil·lar (H_c dinàmic) respecte de l' H_c de descàrrega de la sang que surt d'aquest vas. L' H_c dinàmic pot ser menor, igual o major que l' H_c d'entrada en el vas (Barbee & Cokelet, 1971). L'Efecte Fåhræus es justifica per la diferència de velocitat entre el plasma i les cèl·lules sanguínies.

c) Fenomen d'inversió: efecte que es produeix a causa d'un sobtat augment de viscositat aparent de la sang al disminuir el diàmetre dels capil·lars per sota d'un valor determinat. Aquest fenomen depèn de la naturalesa dels eritròcits, la presència d'agregats tromboeritrocítics, la tonicitat del plasma i la temperatura (Johnson, 1971; Lipowski et al., 1980).

d) Separació del plasma (*plasma skimming*): al circular pels capil·lars, els components del sang no ho fan de forma homogènia sinó que, a les zones pròximes a les parets vasculares, la presència d'elements corpusculars és molt escassa (Krogh et al., 1922). Quan s'arriba a una bifurcació del conducte, la composició de la sang que entra a les vies divergents pot ser molt diversa. Aquest fet vindrà determinat per l'angle format per les dues vies. D'aquí el nom de "separació del plasma", que es deu a que en els capil·lars laterals la transferència de plasma és major, provocant una reducció efectiva de l'Hc (Gelin, 1961).

1.7. L'estrès oxidatiu

L'estrès oxidatiu i els radicals lliures

Tots els habitants d'altres altures estan exposats a alts nivells de radicals lliures y oxidants (Bakonyi & Radak, 2004; Xing et al., 2008). Aquestes espècies químiques, bioproductes del metabolisme mitocondrial anomenades espècies reactives de l'oxigen (*reactive oxygen species*, ROS), inclouen els superòxids (O_2^-), els peròxids (H_2O_2) i els radicals hidroxil (OH^\cdot). Els ROS han estat també associats a neurodegeneracions com l'alzheimer, a malalties cardíaques o càncer, i s'ha demostrat que estan implicats en l'envelliment (Hartzell, 2007). Aquestes molècules, que es formen abundantment durant la hipòxia, són també crucials per al manteniment de l'homeòstasi i poden servir com a molècules senyalitzadores (Xing et al., 2008).

Els orígens de l'O₂ atmosfèric es remunten a uns dos bilions d'anys, essent la fotosíntesi la font principal del mencionat O₂. Aquest O₂ és produït com a conseqüència de l'acció del Fotosistema II, el qual és capaç d'hidrolitzar l'aigua aprofitant-ne l'hidrogen com a font energètica i desprenent l'O₂, que és acumulat a l'atmosfera com a producte secundari. L'augment de la ppO₂ tingué dràstiques conseqüències per als organismes adaptats a viure sense o amb baixes concentracions d'aquest element. Quan la ppO₂ va assolir un nivell significatiu, tot i que encara molt baix, els bacteris van aprendre a utilitzar-lo mitjançant la denominada fosforil·lació oxidativa, tot generant ATP. Un altre benefici, notablement important, de la presència d'O₂ a l'atmosfera va ser el fet d'originar-se l'ozó i de poder filtrar així la radiació ultraviolada (efecte causant d'alta inestabilitat en les molècules d'aquestes primitives formes de vida). No és una coincidència que l'evolució ràpida de la vida, des dels procarïotes als eucariotes i metazous, tingués lloc en el llarg del bilió d'anys de presència d'O₂ i d'ozó. Els organismes vius estan exposats a un complicat equilibri en el qual l'O₂ que sosté les seves vides pot esdevenir una substància molt tòxica per ells. Gràcies a la Selecció Natural, es perfeccionaran elaborats sistemes de defensa que protegiran l'entorn cel·lular de les altes concentracions d'O₂. El marge de seguretat és estret (Vegis Fig. 13).

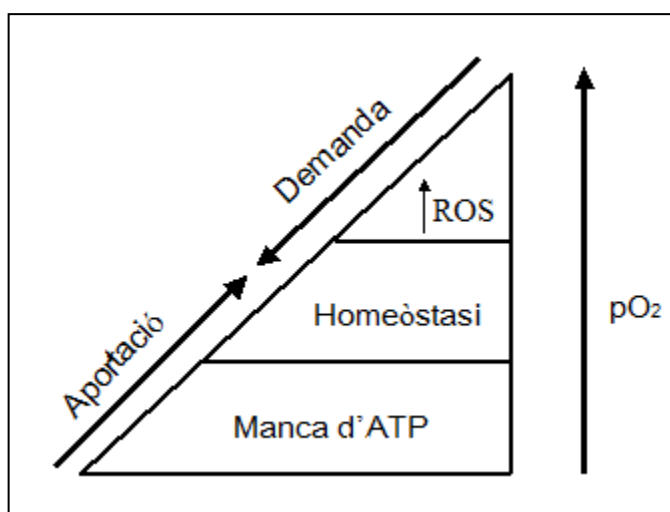


Fig. 13. Homeòstasi de l'O₂ per part dels organismes (Semenza, 2004b).

Què són i com es formen els radicals lliures?

Un radical lliure és una molècula o fragment de molècula que conté un o més electrons no aparellats en el seu orbital més extern. Una substància es pot transformar en un radical lliure o bé per guany o bé per pèrdua d'un electró (del Maestro 1980; Halliwell & Gutteridge, 1999).

La reducció de l'O₂ a aigua pot produir-se per dues vies:

1. A través del sistema citocrom oxidasa, que és capaç de reduir l'O₂ a aigua mitjançant una reducció tetravalent sense produir compostos entremetjats. Aquesta és la via habitual i correspon al 95% de l'O₂ consumit en els teixits.
2. El restant 5% es redueix mitjançant la denominada reducció univalent de l'O₂ en la qual es generen els radicals lliures, en aquest cas d'O₂.

Existeix una gran varietat de ROS, destacant-ne els següents: l'oxigen singlete (¹O₂), l'anió superòxid (O₂⁻), el radical hidroxil (OH·), el radical peroxil (RO₂·), el radical alcoxil (RO·), el peròxid de nitrogen (H₂O₂), l'ozó (O₃), l'àcid hipoclorós (HOCl) i el peroxinitrit (ONOO⁻) (Halliwell & Gutteridge, 1989). El radical superòxid, en solució aquosa, pot actuar com un agent reductor fort o com un oxidant dèbil. Té una vida mitja molt curta i és metabolitzat a peròxid d'hidrogen per la superòxid dismutassa (SOD). Els organismes presenten un eficaç mecanisme de defensa enfront aquest H₂O₂ mitjançant la catalasa (CAT) i la peroxidasa. El perill més gran que comporta l'acumulació de l'ió superòxid i del peròxid d'hidrogen en la cèl·lula és la producció del radical hidroxil a través de la denominada reacció de Heber-Weiss. Aquest radical hidroxil és altament tòxic i l'organisme no té mecanismes de defensa enfront d'ell (Margaill et al., 2005) (Vegi's Fig. 14).

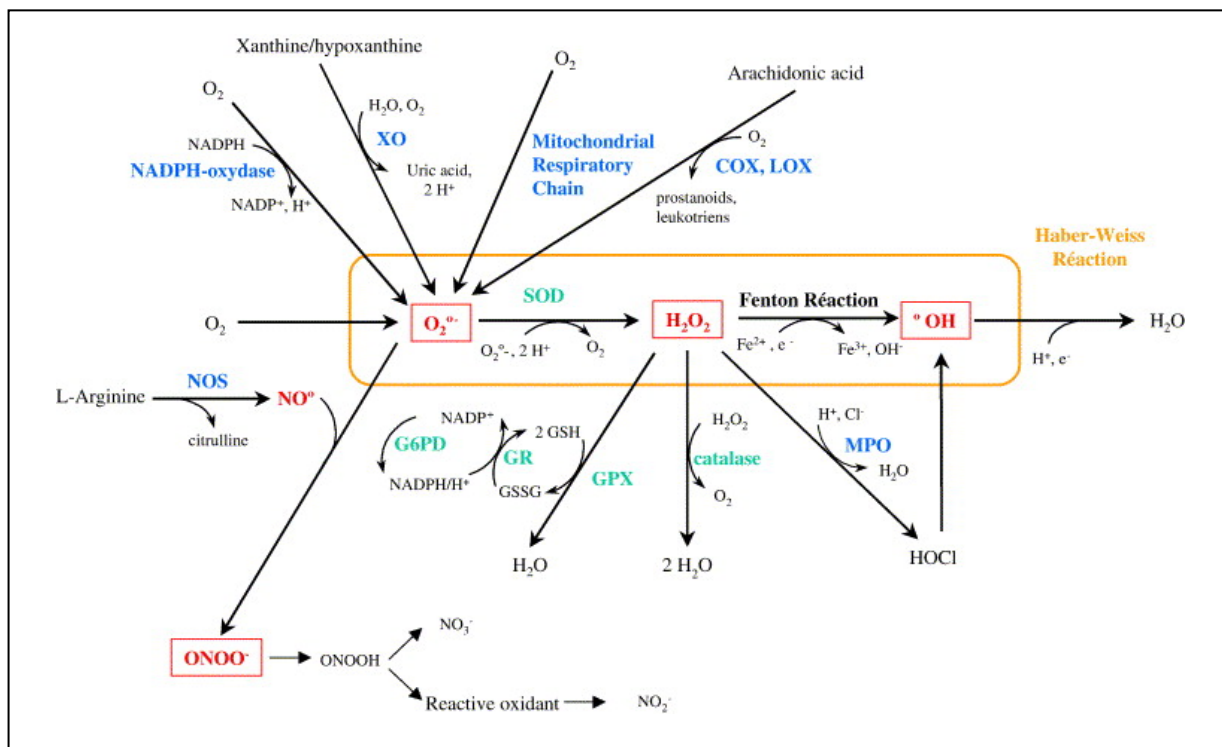


Fig. 14. Fonts de radicals lliures i reacció de Haber-Weiss (Margail et al., 2005).

L'homeòstasi de l'O₂ representa un principi organitzador important en la fisiologia de molts mamífers. Tal com acabem de comentar, els requeriments essencials per dur a terme la fosforil·lació oxidativa (amb l'objectiu de generar ATP), es mantenen equilibrats tot i existir el risc de dany oxidatiu en biomolècules (Semenza, 2000b). Per tant, els efectes dels radicals lliures tindran lloc sobre lípids, ADN, proteïnes i glúcids. En aquest treball ens centrarem específicament en els efectes sobre els lípids, l'anomenada lipoperoxidació.

La lipoperoxidació o procés de degradació oxidativa dels lípids, és segurament el procés més estudiat dels induïts pels ROS. Involucra fonamentalment als àcids grassos poliinsaturats (PUFAs). La taxa de reacció dels radicals amb els lípids de membrana ve condicionada per la quantitat de PUFAs que conté la membrana i pel seu grau d'insaturacions. L'efecte de la

lipoperoxidació és un deteriorament oxidatiu dels lípids poliinsaturats de la membrana. El resultat d'aquest procés produirà una disminució en la fluïdesa de les membranes cel·lulars, afectant a la seva permeabilitat i excitabilitat, impedit que es dugin a terme les seves funcions normals (Vladimirov, 1986; Halliwell & Gutteridge, 1989; Metin et al., 2003). La membrana d'aquestes cèl·lules deixa de mantenir el gradient tònic i, a vegades, es produeix una inflamació tissular (Maridonneau et al., 1983; Merry et al., 1991).

Bàsicament es distingeixen tres etapes en el procés de lipoperoxidació: iniciació, propagació i finalització (Esterbauer et al., 1989; Young & McEneny, 2001). És un procés que, un cop iniciat, s'autoperpetua i té un resultat final que consisteix en la fragmentació del lípid en hidroperòxids i en aldehids citotòxics (Vegi's Fig. 15).

Fase d'iniciació: s'inicia l'oxidació de forma lenta, consumint les substàncies antioxidants de les lipoproteïnes. És el pas on es produeix l'àcid gras radical. Els iniciadors més destacats són els ROS, tal com l' $\text{OH}\cdot$, qui es combina amb un hidrogen per donar lloc a aigua i a un radical d'àcid gras.

Propagació o fase exponencial: com que l'àcid gras radical no és massa estable, reacciona ràpidament amb l' O_2 molecular creant un àcid gras peròxid radical. Aquest també és una espècie molt inestable i per tant, reacciona amb un altre àcid gras donant lloc a un àcid gras radical diferent i a un peròxid lípid (o un peròxid cíclic si ha reaccionat amb ell mateix). Aquest cicle es repeteix de forma continuada.

Fase de finalització: quan un radical reacciona sempre produeix un altre radical, per tant podem dir, que es tracta d'una reacció en cadena. Aquesta reacció s'aturarà quan dos radicals reaccionin i produeixin una espècie no radical. Això només succeeix quan la concentració d'espècies radicals és suficientment alta per a què dos radicals es trobin. Per tal d'accelerar aquest procés de finalització, diverses molècules han evolucionat per ser capaces

d'atrapar aquests radicals lliures i protegir la membrana cel·lular enfront de l'agressió oxidant (vitamina E, SOD, CAT, peroxidasa, etc.).

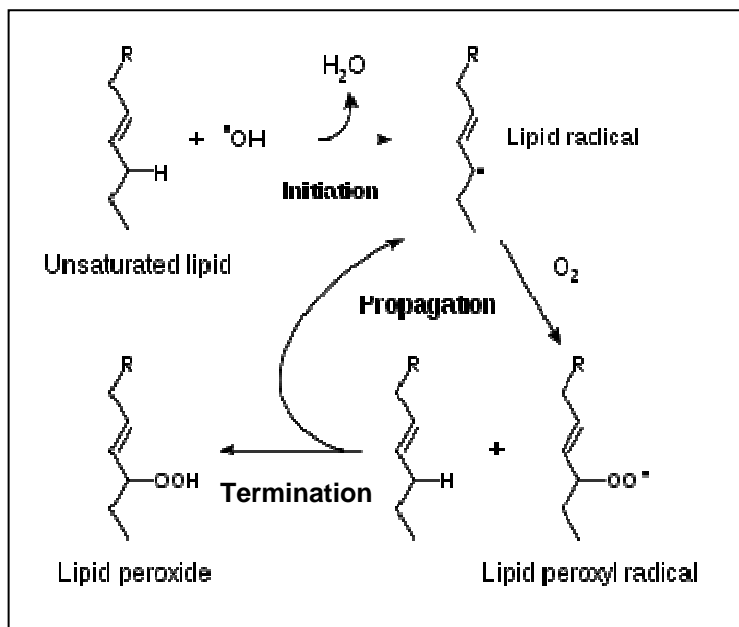


Fig. 15. Seqüència bàsica de reaccions de la peroxidació lipídica.

Avui dia, es coneix que són múltiples les causes responsables de l'activació d'aquests processos oxidatius. Els factors activadors més destacats serien la contaminació atmosfèrica (Kelly, 2004), els aliments i les begudes nocives com l'alcohol (Wu et al., 2006), el tabac (Hays et al., 2006; Samal et al., 2006), la llum ultraviolada, l'ozó (Grella et al., 2002), l'exercici físic intens (Watson et al., 2005; Banfi et al., 2006; Wu et al., 2006), l'estrès, les drogues, etc.

Mecanismes de defensa, els antioxidants

Estudis experimentals indiquen que les cèl·lules i els organismes necessiten defenses contra els agents oxidants i sense aquestes, estaria en joc la seva supervivència en condicions aeròbiques. Enfront d'aquests agents, la

naturalment ha produït una gran quantitat d'antioxidants, els quals estan estratègicament compartimentats en certs orgànuls cel·lulars, amb la finalitat d'oferir-los la màxima protecció enfront dels radicals lliures (Yu, 1994).

Un antioxidant és aquella substància que està present en baixes concentracions, si ho comparem amb les del substrat oxidable, i que disminueix l'oxidació d'aquest (Vegi's Fig. 16).

Espècies Reactives a l'O₂	Antioxidants
¹ O ₂	Vit. A, C i E, β-carotè, àcid úric.
O ₂ ^{-•}	SOD, vit. C i E, β-carotè.
•OH	Grups SH i GSH, àcid úric.
RO•	β-carotè.
ROO•	Vit. E, β-carotè, grups SH i GSH.
H ₂ O ₂	Catalasa, glutatió peroxidasa.
LOOH	Glutatió peroxidasa.

Fig. 16. Alguns dels principals ROS amb els seus corresponents antioxidants biològics.

Tot antioxidant biològic manté les seves propietats en un rang de concentracions fisiològiques, la seva velocitat de reacció amb els radicals lliures d'O₂ és superior a la d'altres molècules i el producte de tal reacció és menys tòxic. En condicions d'elevada producció de radicals lliures d'O₂, la concentració de la majoria d'antioxidants biològics disminueix (vitamina C, àcid úric, etc.). No obstant n'existeixen d'altres, els nivells dels quals poden resultar poc afectats (vitamina E) o, fins i tot, augmentar (ceruloplasmina).

Els antioxidants poden actuar a diferents nivells en la seqüència oxidativa de la lipoperoxidació:

- a) Prevenint el procés d'iniciació de la lipoperoxidació mitjançant la captació de radicals lliures d'O₂. En aquest apartat inclouríem antioxidants enzimàtics i primordialment intracel·lulars, els quals estan

presentes en el citosol i a les mitocòndries (SOD, CAT i glutatió peroxidasa).

- b) Fixant el ferro (transferrina, lactoferrina i ferritina) o coure (metaloproteïnes i albúmina), així com molècules amb capacitat per mantenir el ferro en un estat redox en el qual no sigui capaç de catalitzar la reacció Haber-Weiss (ceruloplasmina).
- c) Descomponent els hidroperòxids (ROOH), implicats en els processos d'estimulació de la lipoperoxidació, convertint-los en alcohols (ROH), que són molècules molt menys reactives. Un exemple seria la glutatió peroxidasa.
- d) Bloquejant la cadena de lipoperoxidació. Són capaços de reduir el radical peroxil (ROO \cdot) i el radical alcoxil (RO \cdot), evitant la propagació de la peroxidació dels lípids. Entre aquests trobem diversos fenols o amines aromàtiques com la vitamina E i el β -carotè.

Per regla general, els antioxidants dels grups 1, 2 i 3 són denominats antioxidants preventius. I els del grup 4, es coneixen amb el nom de *chain breaking*. Si els antioxidants preventius i els *chain breaking* no són totalment efectius, s'acumulen productes de degradació de l'ADN, de membranes, de proteïnes i d'altres compostos, que estimulen múltiples sistemes enzimàtics amb la finalitat de reparar les molècules o estructures malmeses.

Molts antioxidants són incorporats a l'organisme gràcies als aliments. La seva interacció cooperativa al plasma és també important per evitar les reaccions radicalàries en els compartiments extracel·lulars. Els nivells plasmàtics d'antioxidants són fàcils d'avaluar i són indicadors importants del grau de protecció de l'organisme.

Des d'un punt de vista homeostàtic, l'aparició de lesions degudes a l'acció dels ROS depèn del balanç entre el tipus i la quantitat que se'n produeix, així com de la quantitat de mecanismes antioxidants presents en el microambient (Cronhs et al., 2009; Venturini et al., 2010). Una alteració d'aquest equilibri a favor dels agents prooxidants condueix a una agressió oxidativa, la qual està implicada en el desenvolupament de molts processos patològics, però també fisiològics: malalties pulmonars i cardiovasculars, diversos tipus de càncers, exercici físic o envelliment (Hazane-Puch et al., 2010; Liou & Storz, 2010; Muñoz et al., 2010). Dietes equilibrades i riques en antioxidants o suplementades adequadament, poden contribuir a la prevenció de moltes malalties i, fins i tot, a la seva curació (Di Giacomo et al., 2009). Les necessitats en antioxidants varien en funció de les condicions i la situació en què es troba l'organisme.