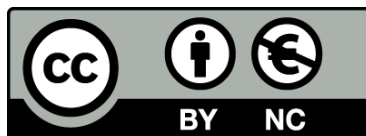




UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Efecto de la hipoxia hipobárica intermitente y el frío en la recuperación de lesiones del músculo esquelético

Garoa Santocildes Martinez



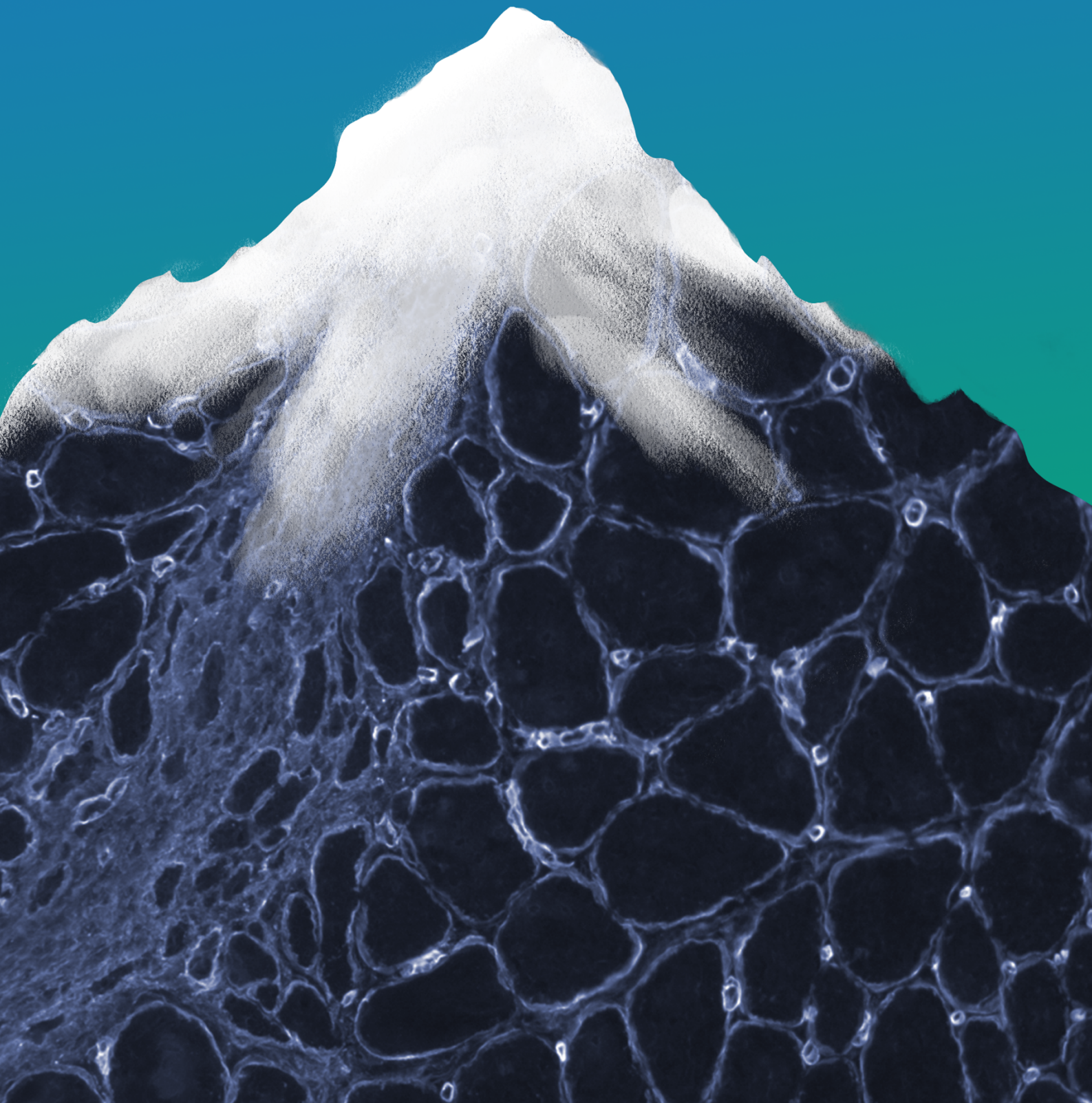
Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0. Spain License.**

Efecto de la hipoxia hipobárica intermitente y el frío en la recuperación de lesiones del músculo esquelético

Garoa Santocildes Martínez



Diseño y realización de la cubierta: Anna-Lina Mattar

Imagen de microscopia cubierta: Garoa Santocildes Martinez (Laboratorio de Fisiología adaptativa: ejercicio e hipoxia)

***Efecto de la hipoxia hipobárica
intermitente y el frío en la recuperación de
lesiones del músculo esquelético***

Garoa Santocildes Martinez

Fisiología adaptativa: ejercicio e hipoxia

Secció de Fisiologia

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

Facultat de Biologia

Universitat de Barcelona

2021



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Universitat de Barcelona

Facultat de Biologia

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

Secció de Fisiologia

Memoria presentada por **Garoa Santocildes Martinez**, graduada en Ciencias de la Actividad Física y el Deporte, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona, por el programa de Doctorado en Biomedicina.

La presente tesis doctoral, ***Efecto de la hipoxia hipobárica intermitente y el frío en la recuperación de las lesiones del músculo esquelético*** ha sido realizada en el grupo de *Fisiología adaptativa: ejercicio e hipoxia* del *Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia (Secció de Fisiologia)* bajo la dirección del Dr. Joan Ramon Torrella Guio y del Dr. Ginés Viscor Carrasco y la tutorización del Dr. Ginés Viscor Carrasco.

Dr. Joan Ramon Torrella Guio

Director de tesis

Dr. Ginés Viscor Carrasco

Director y tutor de tesis

Garoa Santocildes Martinez

Doctoranda

Barcelona, Septiembre de 2021

Nire guraso eta ahizpari eskeinia

Agradecimientos /esker onak

Nací en un paraje natural extraordinario, he crecido rodeada de montañas y naturaleza, y por eso, estas siempre están presentes en cada uno de los recuerdos que albergo de mi infancia. Curiosamente, de forma natural, o no, toda mi vida ha estado ligada a la montaña, mis pasos siempre me han llevado hacia ella, o ella ha venido hacia mí, seguramente nunca sepa quien atrae a quien. Mis pasos por Huesca y Grenoble durante la carrera y mis asiduas visitas de ocio a estas montañas, me han hecho crear un vínculo especial con estas cordilleras, que han marcado mi vida tanto desde un punto académico como personal, y es que más allá de su impactante majestuosidad y belleza, los Pirineos y los Alpes me han regalado personas, vivencias y recuerdos que hacen que hoy yo sea la persona que soy. Paradójicamente, a su manera, esta tesis me devuelve una vez más a la montaña, a la altura, a dónde siempre me lleva el camino.

La montaña requiere de técnica, sacrificio, perseverancia y esfuerzo, pero sobre todo, la montaña no se puede entender sin la pasión, el amor y el respeto hacia la inmensidad de la naturaleza que la rodea. Podría decirse que esta tesis ha sido algo similar a la ascensión a una gran montaña. El camino no ha sido fácil, ha habido pasos complicados, pero también, ha estado lleno de etapas maravillosas. Las jornadas de tormentas y temporales se han alternado con días llenos de sol y claros, y cada caída ha servido para levantarse con un nuevo aprendizaje. La dureza del camino ha hecho que la llegada a la cumbre haya sido emocionante y maravillosa, y que ahora pueda disfrutar más de las vistas y de lo conseguido.

Hay algo que todo buen montañero conoce, y es que nunca se puede ir a la montaña solo. Al igual que hay algo que todo doctorando sabe, que nunca podrá recorrer el viaje de la tesis en solitario. Tengo claro que esta tesis no hubiera sido posible sin todas las personas que me han acompañado a lo largo de camino, y es por ello, que me gustaría agradecer a todas estas personas por su ayuda, apoyo y compañía a lo largo de mi particular ascensión.

Mis primeras palabras de agradecimiento van dedicadas a mis guías, a mis sherpas. Aterricé en el grupo venida de una formación muy diferente y sin conocimientos del trabajo de laboratorio, y ellos me ofrecieron su mano, su tiempo y sus ganas para aprender a caminar en este campo. Probablemente no tenga palabras suficientes para agradecer a Ramón por su tiempo y dedicación, por sus buenas palabras y consejos, y por haberme ayudado tantísimo en cada uno de los pasos de esta tesis, sobre todo en los momentos más difíciles. Gracias por la compañía en las largas jornadas de muestreo y por hacerlas más amenas con buena música y conversación, por despertarme una pasión por la biología animal que desconocía que tuviera, por formarme como docente

y por enseñarme a ser extremadamente exigente y perfeccionista con el trabajo bien hecho. Pero, sobre todo, gracias por la extrema paciencia que has tenido conmigo y por enseñarme a ser paciente; creo que gran parte de esta tesis es culpa tuya. Para Ginés las palabras se quedan pequeñas, es un pozo de sabiduría y de buen humor. Nos ha dado luz cuando estábamos en la oscuridad, ha sido un mapa para no perdernos, siempre ha encontrado la forma de entender lo que a simple vista no tiene explicación. Gracias por tu buen carácter, por las buenas palabras, por estar siempre disponible para ayudar, y por regalarnos grandes momentos de humor. Ha sido un autentico placer haber podido seguir vuestros pasos a lo largo de esta travesía, sin vosotros no hubiera podido hacer este camino. Pero, sobre todo, gracias por vuestra parte humana y por haberme acompañado con tanto mimo. Bueno, y por descubrirme la bombeta, el vino de oporto y la histoquímica !!

Las siguientes palabras de agradecimiento son para mis compañeros del campamento base. Ellos han sido mi refugio en los días más duros de laboratorio y las personas con las que celebrar los grandes días y momentos. A pesar de haber realizado la tesis en solitario nunca he tenido la sensación de que me fáltese un compañero de poyata, de hecho, he tenido la suerte de teneros cerca para las dudas y los problemas, siempre me habéis echado una mano, o incluso un brazo cuando así lo he necesitado. A así que, en lugar de un compañero de poyata yo de esta tesis me llevo un puñado de amigos. Gracias Cris, Sara, Borja, Sergio, Raquel, Ignasi, Irene y Laura por las largas charlas y consejos, por las risas, por las celebraciones hasta cuando no había nada que celebrar, en definitiva, por haber hecho este camino mucho más fácil y bonito. A las chicas de oro del departamento: gracias por los cafés de la mañana, las comidas y por encontrar siempre motivos para organizar una comida y abrir una botella de cava, pero, sobre todo, gracias por cuidarme tanto. También me gustaría agradecer la inestimable ayuda de nuestras técnicas Cris, Marga y Vero, siempre dispuestas a echarnos una cuerda o ponernos una escalera para que podamos seguir avanzando en cada paso hacia la cumbre.

Esta aventura ha supuesto tener que vivir lejos de mi casa, es por ello, que las personas que me han acompañado y me han acogido en Barcelona durante este camino cobran especial importancia. Mis compañeras de piso Maite, Goretti, Maddalen, Èlia, Fu i Vila gracias por hacer que volver a casa tras un duro día de trabajo sea reparador, por estar siempre ahí y por haber creado tantos maravillosos momentos en estos pisos. A la familia del rugby: las Yuuusas, las Boquerons y una larga lista de personas que me ha regalado este maravilloso deporte en Barcelona, gracias por ayudarme a desconectar, a desahogarme, por hacer de los entrenamientos el mejor lugar donde acabar un largo día, gracias por las victorias y por las derrotas, por las miradas de apoyo y por esa mano siempre dispuesta a ayudar, y por encima de todo, gracias por todos los momentos que me habéis regalado fuera de un campo.

En esta larga ascensión ha habido muchos momentos de falta de aire y de fatiga, tanto física como mental. Afortunadamente, mis estancias en Gran Canaria y Copenhague han sido bocanadas de aire fresco, una botella de oxígeno, que te aporta la energía suficiente para seguir adelante. Las estancias han sido auténticas clases magistrales, me han ofrecido la oportunidad de aprender de los mejores y de entender la ciencia desde puntos de vista muy diferentes. Pero, si algo me gustaría destacar de estos grupos son las personas con las que me he encontrado en cada uno de ellos. Conocerlos de cerca me ha servido para entender que el mayor éxito de estos grupos no son sus publicaciones o reconocimientos, sino el maravilloso equipo humano que tienen. Ha sido un placer aprender, compartir y disfrutar de estas estancias con personas tan maravillosas.

Mis últimas palabras van dedicadas a mi mayor apoyo, a mi familia. Ellos han sido mis bastones a lo largo de toda esta ascensión a la cumbre. A mis aietes y amamas, gracias por darme el amor más incondicional del mundo, por enseñarme tanto de la vida, del trabajo y del esfuerzo, y por tener los mejores besos del mundo. A mis padres, Itziar y Rufino, que siempre me han apoyado y empujado a cumplir todos y cada uno de mis sueños. Ellos, que nunca han pensado que hubiera un techo de cristal para mí, que me han dado un pilar sobre el que sustentarme, que me han empujado a caminar y que siempre han estado allí para ayudarme a levantar si lo he necesitado. Ellos, que me han ayudado en todos los planos y aspectos de mi vida, que aunque estén lejos siempre están presentes, y que ante todo siempre me han invitado a disfrutar al máximo de la vida. Y como no, esta tesis es para mi hermana Olatz, mi compañera de cordada. Gracias por quitarme siempre los miedos, por haberme creado este pensamiento crítico, por enseñarme a ser inconformista y a levantar la voz, por hacerme ver que siempre hay alguna lucha que requiere de nuestra fuerza. Gracias por acompañarme en todo, por invitarme a ser una soñadora y por creer en mí por encima de todo. Gracias por ese amor tan incondicional, tan inmenso y tan puro. Y por encima de todo, gracias por regalarme a lo más maravilloso del mundo, a Zumai y a Aretx. Eskerrik asko familia, nire iparrorratz eta sostengu izategatik eta beti nire ondoan egoteagatik, zuek gabe inoiz ez nukeen hau lortuko.

Gràcies a tothom que ha fet que aquesta tesi sigui possible i que m'ha acompanyat en aquest camí.

Eskerrik asko tesi hau posible egin duzuen pertsona guztiei eta bidai honetan lagundu nauzuen guztiei.

Pasioa da hemen exijitzea zilegi den gutxieneko hori.

(Berri Txarrak musika taldea)

La pasión es el mínimo exigible.

(Grupo de musika Berri Txarrak)

Tabla de contenido

RESUMEN	1
ABSTRACT	5
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ABREVIATURAS	19
INTRODUCCIÓN	27
1. MÚSCULO ESQUELÉTICO	29
1.1. Estructura del músculo esquelético.....	29
1.2. Función muscular	34
2. LESIÓN Y REGENERACIÓN MUSCULAR	42
2.1. Lesiones musculares.....	42
2.2. Proceso de regeneración muscular	44
2.3. Re-injury.....	52
2.4. Terapias.....	53
3. REGULACIÓN DE LA MASA Y DE LA REGENERACIÓN MUSCULAR.....	54
3.1. AMPK.....	55
3.2. Vía de señalización de Akt/mTOR.....	58
4. EXPOSICIÓN A AMBIENTES ESTRESANTES	60
4.1. Altitud e hipoxia hipobárica	60
4.2. El frío	68
4.3. La hipoxia hipobárica y el frío	73
5. CONTEXTO	75
OBJETIVOS	79
MATERIALES Y MÉTODOS	85
1. ANIMALES	87
2. INDUCCIÓN QUIRÚRGICA DE LA LESIÓN MUSCULAR.....	87
3. GRUPOS EXPERIMENTALES	88
4. PROTOCOLOS DE INTERVENCIÓN	89
4.1. Exposición a hipoxia hipobárica intermitente [HHI].....	89
4.2. Exposición a frío intermitente [ICE, Intermittent Cold Exposure]:	90
4.3. Exposición simultánea al frío y a la hipoxia intermitente (frío + hipoxia):	90
5. DISECCIÓN Y OBTENCIÓN DE TEJIDOS Y SANGRE	90
6. PRUEBAS FUNCIONALES DE FUERZA.....	91
7. HISTOQUÍMICA.....	94

7.1.	<i>Tinciones histoquímicas</i>	95
7.2.	<i>Medidas morfofuncionales de las fibras</i>	99
8.	WESTERN BLOT	101
8.1.	<i>Extracción de proteína mediante lisado muscular</i>	101
8.2.	<i>Cuantificación de la proteína total</i>	103
8.3.	<i>Western blotting</i>	104
9.	INMUNOFLUORESCENCIA.....	111
10.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	113
RESULTADOS		117
BLOQUE 1		121
1.	BLOQUE 1: VALIDACIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.....	123
1.1.	<i>Simetría anatómica</i>	123
1.2.	<i>Validación del método de lesión</i>	126
BLOQUE 2		129
2.	BLOQUE 2: RESPUESTAS FISIOLÓGICAS AL FRÍO Y LA HIPOXIA.....	131
2.1.	<i>Evolución del peso de los animales y composición corporal</i>	131
2.2.	<i>Parámetros hematológicos</i>	134
2.3.	<i>Área transversal de la fibra y diámetro de Feret</i>	136
2.4.	<i>Capilarización individual de las fibras</i>	138
2.5.	<i>Densidad de fibras, densidad capilar y el cociente capilares por fibra</i>	141
2.6.	<i>Distribución de los diferentes tipos de fibras</i>	142
2.7.	<i>Vía de señalización HIF-1α</i>	143
BLOQUE 3		145
3.	BLOQUE 3: EL FRÍO Y LA HIPOXIA Y SU EFECTO SOBRE LA REGENERACIÓN DEL TEJIDO MUSCULAR	147
3.1.	<i>Evaluación de la función muscular</i>	147
3.2.	<i>Evolución histológica de la lesión</i>	153
3.3.	<i>Respuestas moleculares</i>	155
DISCUSIÓN		165
BLOQUE 1		167
1.	BLOQUE 1: VALIDACIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL	169
1.1.	<i>Simetría anatómica y funcional</i>	169
1.2.	<i>Validación del método de lesión</i>	171

BLOQUE 2	173
2. BLOQUE 2: RESPUESTAS FISIOLÓGICAS A LA EXPOSICIÓN INTERMITENTE A FRÍO E HIPOXIA.....	175
2.1. <i>Respuestas en la masa y la composición corporal</i>	175
2.2. <i>Respuestas hematológicas</i>	179
2.3. <i>Respuestas morfológicas y de capacidad oxidativa del músculo</i>	181
2.4. <i>Resumen Bloque 2</i>	187
BLOQUE 3	189
3. BLOQUE 3: EL FRÍO Y LA HIPOXIA Y SU EFECTO SOBRE LA REGENERACIÓN DEL TEJIDO MUSCULAR	191
3.1. <i>Evaluación de la función muscular</i>	191
3.2. <i>Evolución histológica de la lesión</i>	196
3.3. <i>Respuestas moleculares</i>	201
3.4. <i>Resumen Bloque 3</i>	206
RESUMEN DISCUSIÓN	209
4. RESUMEN GENERAL DE LA DISCUSIÓN.....	211
CONCLUSIONES	217
CONCLUSIONS	221
BIBLIOGRAFÍA	227

Resumen

Los trastornos músculo-esqueléticos son una de las principales causas de necesidad de rehabilitación en el mundo. En el ámbito deportivo, las lesiones del sistema musculoesquelético representan entre el 10-55% del total de las lesiones. Debido a su alta incidencia e impacto sobre la salud, el proceso de regeneración muscular ha sido ampliamente estudiado y caracterizado, pero todavía se continúa en la búsqueda de estrategias terapéuticas que puedan acelerar el proceso de regeneración muscular y mejorar el tejido muscular post-lesión. Gracias a su alta plasticidad el músculo esquelético se adapta y responde ante diferentes estímulos con la finalidad de mantener la homeostasis y mejorar su funcionalidad. La hipoxia hipobárica intermitente (HHI) ha demostrado que puede mejorar el transporte, liberación y uso del oxígeno a nivel muscular, pero su coexistencia con el frío en la biosfera abre las puertas a considerar el uso combinado del frío y la hipoxia como herramienta para lograr beneficiosas adaptaciones fisiológicas y musculares. Por todo ello, en la presente tesis se estudian los efectos de la exposición a la HHI y al frío, de forma independiente y combinada, en la fisiología de los animales y sobre los procesos de regeneración muscular.

Se utilizaron machos-adultos de ratas Sprague-Dawley como modelo experimental. Los animales fueron quirúrgicamente lesionados en su músculo gastrocnemio y aleatoriamente divididos en diferentes grupos: 1) Grupo CTRL: animales con recuperación pasiva; 2) Grupo COLD: animales expuestos a frío intermitente (4°C); 3) Grupo HYPO: animales expuestos a HHI (altitud simulada 4500 m); 4) Grupo COHY: animales expuestos a frío e hipoxia intermitente simultáneamente (4500 m + 4°C). Las ratas fueron sometidas a las diferentes intervenciones durante 4 horas por día a lo largo de 9 o 21 días. Además, se incluyeron 2 grupos adicionales, uno con la finalidad de corroborar la simetría morfo-funcional entre el gastrocnemio derecho e izquierdo y el otro, para validar el método de lesión.

Los resultados mostraron la existencia de una simetría tanto morfológica (área transversal de las fibras y proporción de fibras) como funcional (fuerza y resistencia a la fatiga) entre el gastrocnemio derecho e izquierdo de las ratas. El método de lesión utilizado demostró ser útil, produciendo alteraciones tanto en la arquitectura del tejido como en su capacidad funcional. El uso de exposiciones intermitentes garantizó un

crecimiento normal y el incremento de la masa muscular de los animales induciendo, además, respuestas de aclimatación como incrementos del tejido adiposo marrón en los grupos expuestos al frío (COLD y COHY) e incrementos en el transporte de oxígeno en sangre en los animales sometidos a HHI (HYPO y COHY). A nivel muscular, el grupo COLD exhibió mejoras en la capilaridad muscular mediante incrementos de VEGF y del número de capilares, mientras que los grupos HYPO y COHY mejoraron la irrigación de las fibras gracias a la reducción del tamaño de las fibras, pero sin detectarse un proceso angiogénico. Los animales de los grupos COHY y COLD presentaron una acelerada regeneración muscular, observada a nivel histológico a los 9 días (reducción del porcentaje de fibras positivas en dMHC y con núcleos centrales) y a nivel funcional a los 21 días. El grupo HYPO mostró una completa recuperación de la lesión muscular (a nivel histológico y funcional) en 9 días. Además la HHI demostró ser un interesante anti-fibrótico reduciendo la deposición de colágeno I en el lugar de la lesión. El incremento en el cociente $p\text{Ser}^{473}\text{Akt}/\text{Akt}$ total observado tras 9 días de tratamiento en los grupos COLD, HYPO y COHY, junto con el incremento en el cociente $p\text{Thr}^{172}\text{AMPK}\alpha/\text{AMPK}\alpha$ total observado en el músculo gastrocnemio del grupo HYPO, proporcionan indicios de los posibles mecanismos responsables de la mejora de la regeneración muscular observada.

Abstract

Musculoskeletal disorders are one of the main causes of requirement for functional rehabilitation in the world. In sports, musculoskeletal system injuries represent between 10-55% of all sustained injuries. Because of its high incidence and impact on health, skeletal muscle regeneration process has been extensively studied and characterized. However, still new therapeutic strategies need to be studied in order to accelerate the muscle regeneration process and ameliorate muscle tissue after injury. Due to its high plasticity, skeletal muscle can adapt and respond to different stimuli in order to maintain the homeostasis and improve its functionality. It has been well established that intermittent hypobaric hypoxia (HHI) can improve muscle oxygen transport, delivery and utilization. However, hypobaric hypoxia always coexist with cold in the biosphere, opening the possibility to consider the combined use of the exposure to these two environmental factors as a tool to achieve beneficial physiological and muscular adaptations. Therefore, in the present thesis we studied the effects of HHI and intermittent cold exposure, separately and in combination, on the physiology of an animal model and more specifically on the processes of muscle regeneration.

Sprague-Dawley adult-male rats were used as an experimental model. The animals were surgically injured in one of their gastrocnemius muscles and then randomly divided into different groups: 1) CTRL group: animals with passive recovery; 2) COLD group: animals exposed to intermittent cold (4°C); 3) HYPO group: animals submitted to HHI (simulated altitude of 4,500 m); 4) COHY group: animals exposed to intermittent cold and hypoxia simultaneously (4,500 m + 4°C). All animals were subjected to the different interventions for 4 h/day during 9 or 21 days. Moreover, two additional groups were included, the first one to corroborate morpho-functional symmetry between the right and left gastrocnemius muscles, and the second one to validate the protocol of injury induction.

Our results showed the existence of morphological (fibre cross-sectional area and fibre proportion) and functional (force and resistance to fatigue) symmetry between the right and the left gastrocnemius muscles of the rats. The method used to induce a muscle injury was proved optimal, because it caused functional and structural disorders. The use of intermittent exposure protocols guaranteed normal growth and increased

muscle mass in the animals, additionally inducing acclimatative responses such as increments in brown adipose tissue in the animals exposed to cold (COLD and COHY) and increments in blood oxygen transport capacity in animals exposed to hypoxia (HYPO and COHY). At the muscular level, the COLD group exhibited enhanced muscle capillarisation, through increments in VEGF and in the number of capillaries, whilst HYPO and COHY groups improved skeletal muscle vascularisation due to a reduction in fibre size, but without detecting an increased angiogenic process. Animals from COLD and COHY groups presented faster muscle regeneration, which was observed at the histological level after 9 days (reduction in the percentage of dMHC positive fibres and with central myonuclei) and at the functional level after 21 days. HYPO group showed a fully recovery from injury (both at the histological and functional levels) after 9 days. Furthermore, HHI can be postulated as an interesting anti-fibrotic, by reducing collagen I deposition at the site of injury. The increase in the pSer⁴⁷³Akt/total Akt ratio observed after 9 days of treatment in the COLD, HYPO and COHY groups, together with the increase in the pThr¹⁷²AMPK α /total AMPK α ratio observed in the gastrocnemius muscles of HYPO groups, provide clues to the possible responsible mechanisms involved in the observed improvement of muscle regeneration.

Índice de figuras y
tablas

Figura 1: Estructura y organización microscópica del tejido muscular.	31
Figura 2: Estructura microscópica y disposición de un sarcómero..	33
Figura 3: Fases del ciclo de contracción muscular.	35
Figura 4: Fuerza de contracción a diferentes frecuencias de estimulación.	37
Figura 5: Fases del proceso de regeneración muscular..	45
Figura 6: Miogénesis del tejido muscular adulto durante la regeneración muscular	50
Figura 7: Esquema de las principales vías de señalización muscular involucradas en la regulación del tamaño de las fibras.	55
Figura 8: Esquema representativo de la cascada de oxígeno a nivel del mar y a 5.800 m.	60
Figura 9: Respuestas de aclimatación y adaptativas a la hipoxia a lo largo del tiempo..	62
Figura 10: Corte transversal de una pata de rata.	99
Figura 11: Muestra microfotográfica de las diferentes tinciones histológicas.	100
Figura 12: Registros de los diferentes parámetros de funcionalidad muscular evaluados en el gastrocnemio derecho e izquierdo.....	124
Figura 13: Área transversal de las fibras de los músculos gastrocnemios derecho e izquierdo	125
Figura 14: Distribución de los diferentes tipos de fibras en el músculo gastrocnemio derecho e izquierdo.	126
Figura 15: Registros de los parámetros de funcionalidad muscular 24 h post-lesión..	127
Figura 16: Imagen representativa de la lesión muscular 24 h post-lesión.....	128
Figura 17: Evolución del peso corporal de los animales.	131

Figura 18: Parámetros hematológicos.	134
Figura 19: Morfometría de los diferentes tipos de fibras del músculo gastrocnemio..	137
Figura 20: Capilarización individual de las fibras del músculo gastrocnemio.	140
Figura 21: Parámetros morfométricos y de capilarización global del músculo gastrocnemio.	141
Figura 22: Distribución de los diferentes tipos de fibras en el músculo gastrocnemio.	142
Figura 23: Expresión de proteínas de la vía de señalización del factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α).	143
Figura 24: Parámetros de funcionalidad muscular evaluados en el músculo gastrocnemio post-lesión.....	148
Figura 25: Distribución y área transversal de las fibras tipo I y tipo II en el músculo gastrocnemio..	152
Figura 26: Resultados de la evolución histológica de la lesión muscular.....	153
Figura 27: Expresión de las proteínas Akt y pSer ⁴⁷³ Akt en el músculo gastrocnemio lesionado (injured) y no lesionado (non-injured).....	156
Figura 28: Expresión de las proteínas mTOR y pSer ²⁴⁴⁸ mTOR en el músculo gastrocnemio lesionado (injured) y no lesionado (non-injured).....	158
Figura 29: Expresión de las proteínas AMPK α y pThr ¹⁷² AMPK α en el músculo gastrocnemio lesionado (injured) y no lesionado (non-injured).....	161

Tabla 1: Tipos y características de las fibras musculares.	41
Tabla 2: Clasificación de los diferentes tipos de fibras en base a la tinción mATPasa y SDH	100
Tabla 3: Pesos de los músculos de las patas traseras derecha e izquierda de las ratas	124
Tabla 4: Parámetros de composición corporal.	133
Tabla 5: Índices hematimétricos.....	135
Tabla 6: Pesos de los gastrocnemios lesionados y contralaterales no lesionados de los diferentes grupos experimentales	150

Abreviaturas

AMPK	Proteína quinasa activada por AMP (<i>AMP-activated Protein Kinase</i>)
BAT	Tejido adiposo marrón o pardo (<i>Brown Adipose Tissue</i>)
BW	Masa corporal (<i>Body Weight</i>)
CCA	Número de capilares por cada 1000 μm^2 de área de fibra (<i>Capillary Counts per Area</i>)
CD	Densidad capilar (<i>Capillary Density</i>)
COHY	Grupo frío intermitente + hipoxia
COLD	Grupo frío intermitente
CT	Tiempo de contracción (<i>Contraction Time</i>)
CTRL	Grupo control
C/F	Cociente entre el número de capilares y el número de fibras (<i>Capillary-to-Fibre ratio</i>)
dMHC	Miosina de desarrollo de cadena pesada (<i>Developmental Myosin Heavy Chain</i>)
eATPasa	Adenosina-trifosfatasa endotelial
ECM	Matriz extracelular (<i>Extracellular Matrix</i>)
EDL	Músculo extensor largo de los dedos (<i>Extensor Digitorum Longus</i>)
EPO	Eritropoyetina
FCSA	Área de la sección transversal de las fibras (<i>Fibre cross Sectional Area</i>)
FD	Densidad de fibras (<i>Fibre Density</i>)

Abreviaturas

FG	Fibras rápidas glucolíticas (<i>Fast Glycolytic</i>)
FIG	Fibras rápidas intermedias glucolíticas (<i>Fast Intermediate Glycolytic</i>)
FOG	Fibras rápidas oxidativas glucolíticas (<i>Fast Oxidative Glycolytic</i>)
GAS	Músculo gastrocnemio
GLUT1	Transportador de glucosa 1 (<i>Glucose Transporter 1</i>)
Htc	Hematocrito
Hb	Hemoglobina
HHI	Hipoxia hipobárica intermitente
HIF-1	Factor inducible por hipoxia 1 (<i>Hypoxia Inducible Factor 1</i>)
HRT	Tiempo medio de relajación (<i>Half-Relaxation Time</i>)
HYPO	Grupo hipoxia hipobárica intermitente
ICE	Exposición al frío intermitente (<i>Intermittent Cold Exposure</i>)
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico 1 (<i>Insulin Growth Factor 1</i>)
IL	Interleuquina (<i>Interleukin</i>)
LFF	Fatiga a baja frecuencia (<i>Low Frequency Fatigue</i>)
mATPasa	Miosina adenosina-trifosfatasa
MCH	Hemoglobina corpuscular media (<i>Mean Corpuscular Hemoglobin</i>)
MCHC	Concentración de hemoglobina corpuscular media (<i>Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration</i>)

MCV	Volumen corpuscular medio (<i>Mean Corpuscular Volume</i>)
MHC	Cadena de miosina pesada (<i>Myosin Heavy Chain</i>)
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero (<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>)
MRF	Factores reguladores miogénicos (<i>Myogenic Regulatory Factors</i>)
MuSC	Células satélite musculares (<i>Muscle Satellite Cells</i>)
Myf5	Factor miogénico 5 (<i>Myogenic Regulatory Factor 5</i>)
MyoD	Proteína de diferenciación miogénica 1 (<i>Myoblast determination protein</i>)
NCF	Número de capilares en contacto con cada fibra
NST	Termogénesis no basada en tiriteo (<i>Non-shivering Thermogenesis</i>)
PAH	Hipertensión arterial pulmonar (<i>Pulmonary Arterial Hypertension</i>)
PAT	Tejido adiposo perigonadal (<i>Perigonadal Adipose Tissue</i>)
Pax7	Proteína de caja emparejada 7 (<i>Paired box protein 7</i>)
PGC-1 α	Coactivador del receptor gamma 1 α activado por el proliferador de peroxisomas (<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator coactivator 1α</i>)
PO ₂	Presión parcial de oxígeno
p70S6K	Proteína ribosomal S6 kinasa p70 (<i>p70 ribosomal protein S6 kinase</i>)
RS	Retículo sarcoplasmático
RBC	Glóbulos rojos (<i>Red Blood Cells</i>)

Abreviaturas

SDH	Succinato deshidrogenasa
SO	Fibras lentas oxidativas (<i>Slow Oxidative</i>)
SOL	Músculo sóleo
ST	Termogénesis de tiriteo (<i>Shivering Thermogenesis</i>)
TA	Músculo tibial anterior
TetF	Fuerza tetánica máxima (<i>Maximum Tetanic Force</i>)
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformable beta 1 (<i>Transforming Growth Factor Beta 1</i>)
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa (<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>)
VEGF	Factor de crecimiento endotelial (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
WBC	Glóbulos blancos (<i>White Blood Cells</i>)
4E-BP	Proteína de unión al factor de iniciación de la traducción eucariota 4E (<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein</i>)

Introducción

1. Músculo esquelético

El músculo esquelético representa aproximadamente el 40% del peso corporal total de los mamíferos, siendo el órgano más abundante (Huard *et al.*, 2002; Mizunoya *et al.*, 2014; Silverthorn, 2019). La función principal de los músculos es la de generar fuerza y movimiento, así como estabilizar las articulaciones y mantener o corregir las posiciones corporales. Además, el músculo esquelético es una fuente de producción de calor y participa de forma activa en la termorregulación (Tortora & Derrickson, 2018; Silverthorn, 2019). Cabe destacar cuatro propiedades del tejido muscular: 1) la excitabilidad eléctrica: capacidad para responder ante diferentes estímulos mediante la generación de señales eléctricas (potenciales de acción); 2) contractilidad: capacidad de contraerse y generar tensión o fuerza de contracción ante un potencial de acción que lo estimule; 3) extensibilidad: capacidad de ser estirado sin sufrir daño o lesión; 4) elasticidad: capacidad para recuperar su longitud y forma originales tras ser sometido a una extensión o contracción (Tortora & Derrickson, 2018).

1.1. Estructura del músculo esquelético

El músculo esquelético es un conjunto de cientos a miles de células o fibras musculares (miocitos) que funcionan como una unidad. Cada músculo está envuelto en un tejido conectivo (epimisio) que lo protege y refuerza. Las fibras musculares, a su vez, se agrupan en fascículos (grupos de 10 a 100 fibras adyacentes), los cuales están rodeados por una vaina de tejido conectivo llamado perimisio (**Figura 1**). Finalmente, cada fibra muscular, junto con el nervio y los capilares sanguíneos asociados a ella, están envueltos por el endomisio (**Figura 1**). En los músculos esqueléticos, estas tres capas principales de tejido conectivo o matriz extracelular (ECM, *extracellular matrix*) que conforman el músculo se extienden más allá de las fibras musculares y forman el tendón (Tortora & Derrickson, 2018; Silverthorn, 2019; Butler *et al.*, 2021). Al punto de unión del extremo de las fibras musculares y el tendón se le denomina unión miotendinosa y puede llegar a soportar una fuerza de tensión de alrededor de 1000 kg (Kääriäinen *et al.*, 2000). Por lo general, los músculos esqueléticos están unidos a los huesos o cápsulas articulares a través de los tendones (Silverthorn, 2019; Butler *et al.*, 2021), los cuales

están principalmente formados por fibras de colágeno. Estas fibras de colágeno confieren a los tendones fuerza de tensión y elasticidad, y capacidad de absorber los impactos, posibilitando así, por ejemplo, a los vertebrados terrestres a correr y saltar (Kääriäinen *et al.*, 2000; Butler *et al.*, 2021).

La irrigación muscular, está organizada jerárquicamente, de forma que las arterias musculares principales van progresivamente ramificándose en vasos más pequeños, hasta llegar a formarse los capilares fibrilares (Shadrin *et al.*, 2016).

1.1.1. Anatomía microscópica de la fibra muscular

Las fibras musculares son las células más grandes del cuerpo (Silverthorn, 2019), son cilíndricas y alargadas, y son el elemento estructural básico del músculo esquelético (Huard *et al.*, 2002; Tortora & Derrickson, 2018). Durante el desarrollo embrionario, cada fibra muscular nace de la fusión de 100 o más mioblastos o células mesodérmicas, lo cual conlleva a que las fibras musculares sean multinucleadas. Los núcleos de las células musculares maduras (mionúcleos) se encuentran debajo del sarcolema, o membrana plasmática de las fibras, en una posición periférica (**Figura 1**). Los mionúcleos pueden desaparecer por procesos de apoptosis (por ejemplo, en casos de distrofia muscular) o aumentar en número gracias a la activación y fusión de las células satélite (por ejemplo, durante la reparación del tejido muscular o la hipertrofia) (Huard *et al.*, 2002; Ciciliot & Schiaffino, 2010; Tortora & Derrickson, 2018).

El sarcoplasma, citoplasma de las células musculares, contiene una importante cantidad de glucógeno, mitocondrias y mioglobina, pero principalmente está compuesto por unas finas estructuras llamadas miofibrillas. Las miofibrillas son los orgánulos contráctiles del músculo y se extienden a lo largo de toda la fibra muscular. Cada miofibrilla está rodeada de retículo sarcoplasmático (RS), lugar donde se concentra y almacena el calcio (Ca^{2+}). El RS está formado por unos túbulos longitudinales con terminaciones dilatadas (cisternas terminales). De estas cisternas terminales brotan los túbulos transversos (túbulos T), los cuales emergen en el exterior de la célula, formando invaginaciones en la superficie del sarcolema que penetran hasta las cisternas

terminales del interior de la célula. Al complejo formado por un túbulo T y dos cisternas terminales se le denomina tríada. Los túbulos T contienen en su interior líquido extracelular, y permiten que los potenciales de acción que se propagan a lo largo del sarcolemma viajen con rapidez al interior de fibra, garantizando la excitación simultánea de todas las partes de la fibra muscular (**Figura 1**) (Tortora and Derrickson, 2018; Silverthorn *et al.*, 2019).

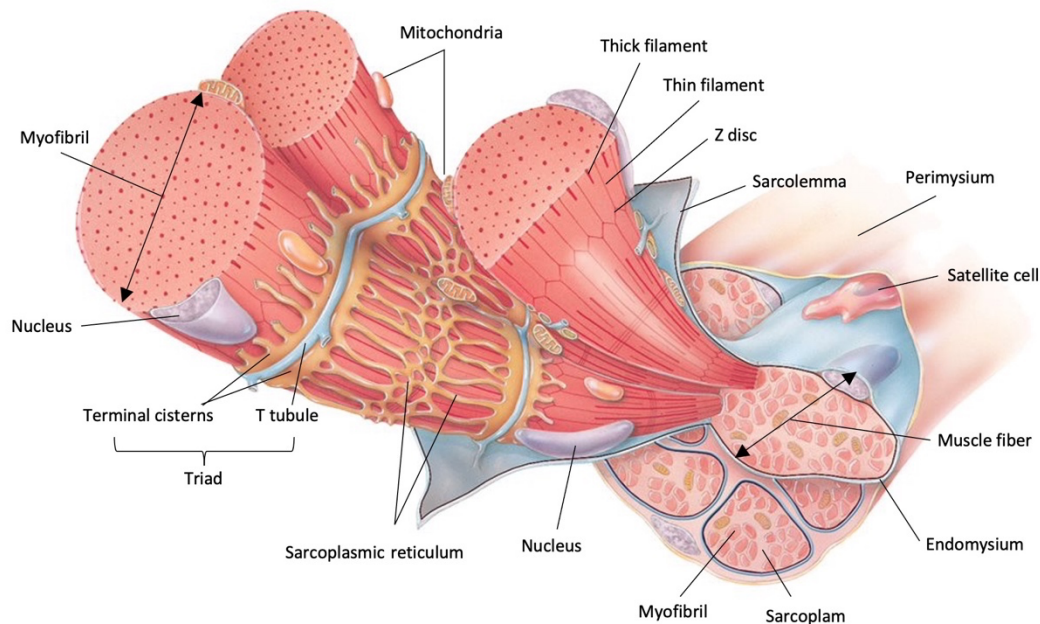


Figura 1: Estructura y organización microscópica del tejido muscular. Adaptada de Tortora & Grabowski (2002).

1.1.1.1. Miofibrillas y proteínas musculares

Las miofibrillas están formadas por estructuras proteicas más pequeñas, llamadas filamentos o miofilamentos. Existen dos tipos de filamentos, los filamentos delgados formados mayoritariamente por la proteína actina, y los filamentos gruesos compuestos en su mayor parte por la proteína miosina. Cada filamento no se extiende a lo largo de toda la miofibrilla, sino que se encuentra agrupado en unidades funcionales y estructurales básicas llamadas sarcómeros. Los sarcómeros son estructuras filamentosas que presentan un patrón repetitivo a lo largo de toda la miofibrilla. Cada miofibrilla puede contener de cientos a miles de sarcómeros (Tortora & Derrickson, 2018; Silverthorn, 2019; Butler *et al.*, 2021).

En las miofibrillas encontramos tres tipos de proteínas: 1) proteínas contráctiles, las cuales generan fuerza durante el proceso de contracción; 2) proteínas reguladoras, las cuales ayudan a activar y desactivar los procesos de contracción muscular; y 3) proteínas estructurales, que mantienen la alineación de los filamentos, proporcionan elasticidad y extensibilidad a las miofibrillas y conectan la matriz extracelular y las miofibrillas (Tortora & Derrickson, 2018; Silverthorn, 2019; Butler *et al.*, 2021).

Las proteínas contráctiles son la miosina y la actina. La miosina es una proteína motora, que tiene la capacidad de transformar la energía química del ATP (adenosín trifosfato) en energía mecánica, es decir, puede producir fuerza de contracción. La cabeza de la miosina presenta dos puntos de unión, un punto de unión con la actina y un punto de unión con el ATP (actividad ATPasa), mientras que la cola de la miosina se dirige hacia la línea M del centro del sarcómero y junto a las colas de las miosinas adyacentes forma el eje del filamento grueso. Por su parte, cada molécula de actina tiene un punto de unión a la miosina. Las moléculas de actina individuales se unen para formar una hélice, la cual da lugar al filamento delgado (**Figura 2b**) (Tortora & Derrickson, 2018; Silverthorn, 2019; Butler *et al.*, 2021).

Entre las proteínas reguladoras encontramos la tropomiosina y troponina (ambas forman parte de los filamentos delgados). Cuando el músculo se encuentra en relajación, hebras de tropomiosina cubren los puntos de unión de la miosina, evitando así su unión con la actina. Por su parte, las moléculas de troponina, ayudan a mantener las hebras de tropomiosina en su sitio. Por último, entre las proteínas estructurales clave encontramos la titina, la nebulina, la α -actinina, la miomesina y la distrofina. La titina y la nebulina son las encargadas de la correcta alineación de los filamentos gruesos y delgados. Además, la titina, proteína gigante cuya longitud equivale a la mitad del sarcómero, confiere en gran medida la elasticidad y extensibilidad a los músculos, ayudando a la recuperación de su longitud original tras una elongación o contracción (Tortora & Derrickson, 2018; Silverthorn, 2019; Butler *et al.*, 2021).

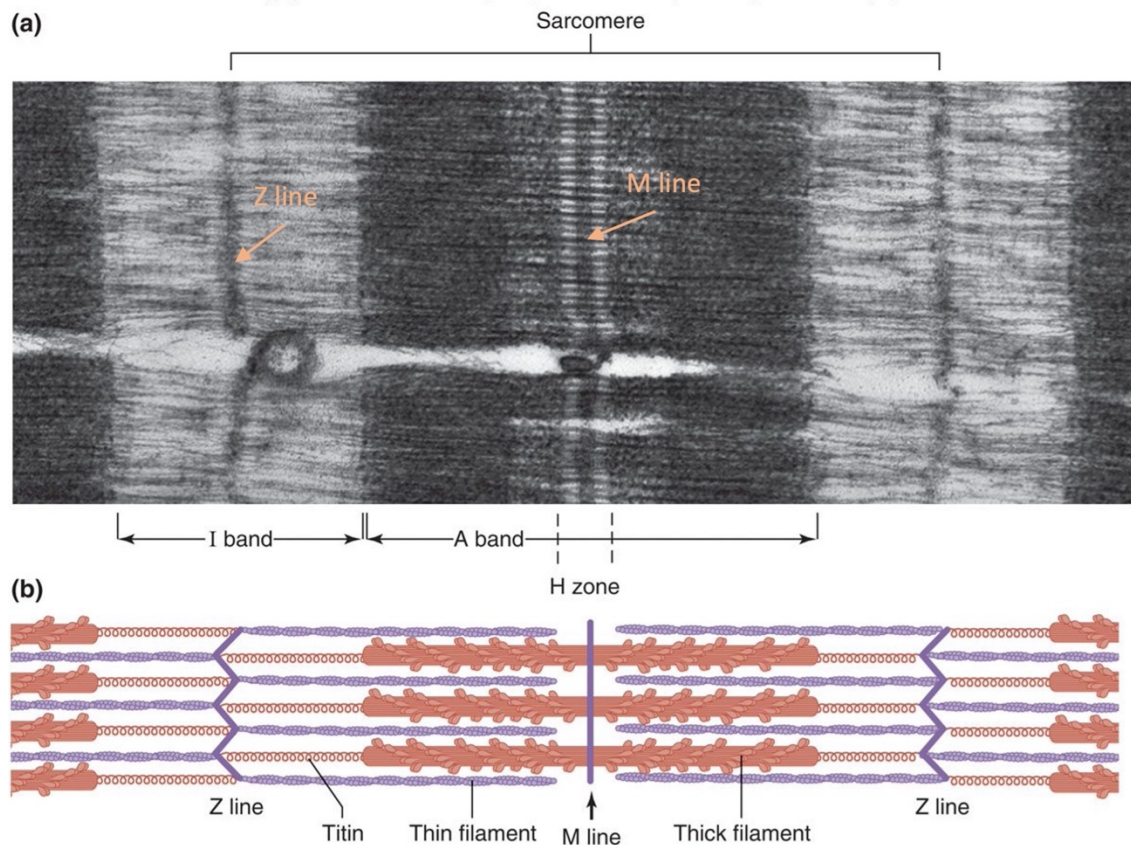


Figura 2: Estructura microscópica y disposición de un sarcómero. (a) Micrografía electrónica de un sarcómero; (b) Esquema de la estructura y disposición de un sarcómero. Adaptada de Widmaier *et al.* (2006).

Los componentes de los sarcómeros se encuentran estructurados en diferentes bandas o zonas. Un sarcómero cuenta con un disco Z en cada uno de sus extremos, estos sirven de lugar de unión a los filamentos delgados y separan los sarcómeros entre sí. La banda A se extiende a lo largo de los filamentos gruesos, y es la parte más oscura del sarcómero (de esa propiedad deriva su denominación: banda anisótropa, que no deja pasar la luz). En la zona final de las bandas A, los filamentos gruesos y delgados se superponen. La zona H, corresponde a la zona central de la banda A, donde exclusivamente se encuentran los filamentos gruesos. En el centro de la zona H nos encontramos con la línea M, la cual mantiene unidos los filamentos gruesos en el centro de la zona H. Finalmente, la banda I corresponde a la zona donde exclusivamente se encuentran los filamentos delgados, es una zona de color claro o isótropa (deja pasar la luz uniformemente), y es atravesada por el centro por un disco Z. Es la alternancia y repetición a lo largo de la miofibrilla de las bandas I y bandas A (zonas claras y oscuras

respectivamente) lo que le otorga la apariencia estriada al músculo esquelético (**Figura 2**) (Tortora & Derrickson, 2018; Silverthorn, 2019; Butler *et al.*, 2021).

1.2. Función muscular

1.2.1. Acoplamiento excitación-contracción

Se denomina acoplamiento excitación-contracción a los diferentes eventos que se llevan a cabo desde la generación del potencial de acción en el músculo hasta el deslizamiento de los filamentos. Los potenciales de acción llegan a la unión neuromuscular (sinapsis entre una motoneurona o neurona motora somática y una fibra muscular) a través de los axones terminales de las motoneuronas. En la unión neuromuscular, el neurotransmisor acetilcolina es liberado por los axones terminales, y sus receptores provocan la apertura de canales iónicos. La apertura de los canales iónicos permite la entrada de sodio (Na^+) al interior de la fibra muscular generando un potencial de acción. El potencial de acción viajará a través del sarcolema y se propagará al interior de la célula a través de los túbulos T, provocando la liberación de Ca^{2+} del interior del RS hacia al citosol. Cuando los potenciales de acción cesan, los iones de calcio son secuestrados desde el citosol al RS mediante bombas de calcio (López Chicharro & Fernández Vaquero, 2006; Silverthorn, 2019).

1.2.2. Ciclo contracción muscular

El ciclo de contracción muscular comienza con la liberación de Ca^{2+} desde el RS hacia el sarcoplasma. Una vez liberado, el ión Ca^{2+} se une a la troponina provocando el desplazamiento de la tropomiosina, y por lo tanto, dejando libres los puntos de unión de la actina con la miosina y permitiendo que estas se unan, momento en el que tiene lugar el inicio del ciclo de contracción. El ciclo de contracción puede dividirse en 4 pasos: 1) la cabeza de miosina hidroliza el ATP a ADP (adenosín difosfato) y un grupo fosfato (Pi). La energía generada como consecuencia de esta reacción es almacenada en la cabeza de la miosina. En este momento, la cabeza de la miosina se encuentra perpendicular (ángulo 90°) respecto a los filamentos gruesos y delgados, mostrando una

orientación propicia para unirse a una molécula de actina; 2) La cabeza de miosina energizada, se une a la actina en un punto concreto, generando los denominados *puentes cruzados*; 3) Tras la formación de los puentes cruzados, la cabeza de la miosina gira cambiando su posición a 45° en relación con los filamentos gruesos y delgados. Durante el cambio de posición, la miosina tracciona del filamento delgado, de forma que este se separa del filamento grueso y se desplaza hacia el centro del sarcómero, generando así tensión o fuerza, acción llamada golpe de fuerza. Una vez acaba esta fase de deslizamiento el ADP es liberado de la cabeza de la miosina; 4) El puente cruzado, formado por la actina y la miosina, se mantendrá adherido hasta que la actina se una a otra molécula de ATP momento en el cual ambas se separarán. Este proceso se lleva a cabo de manera asincrónica entre los distintos puntos de unión, de forma que, en un determinado momento algunas cabezas de miosina estarán formando junto a la actina *puentes cruzados*, mientras que otras estarán separadas de la actina preparándose para una futura unión. Esta alternancia en la formación de *puentes cruzados* es la que permite el deslizamiento de los sarcómeros. El ciclo de contracción se mantendrá siempre y cuando se disponga de ATP y las concentraciones de Ca^{2+} en el citosol sean adecuadas (**Figura 3**) (Tortora & Derrickson, 2018).

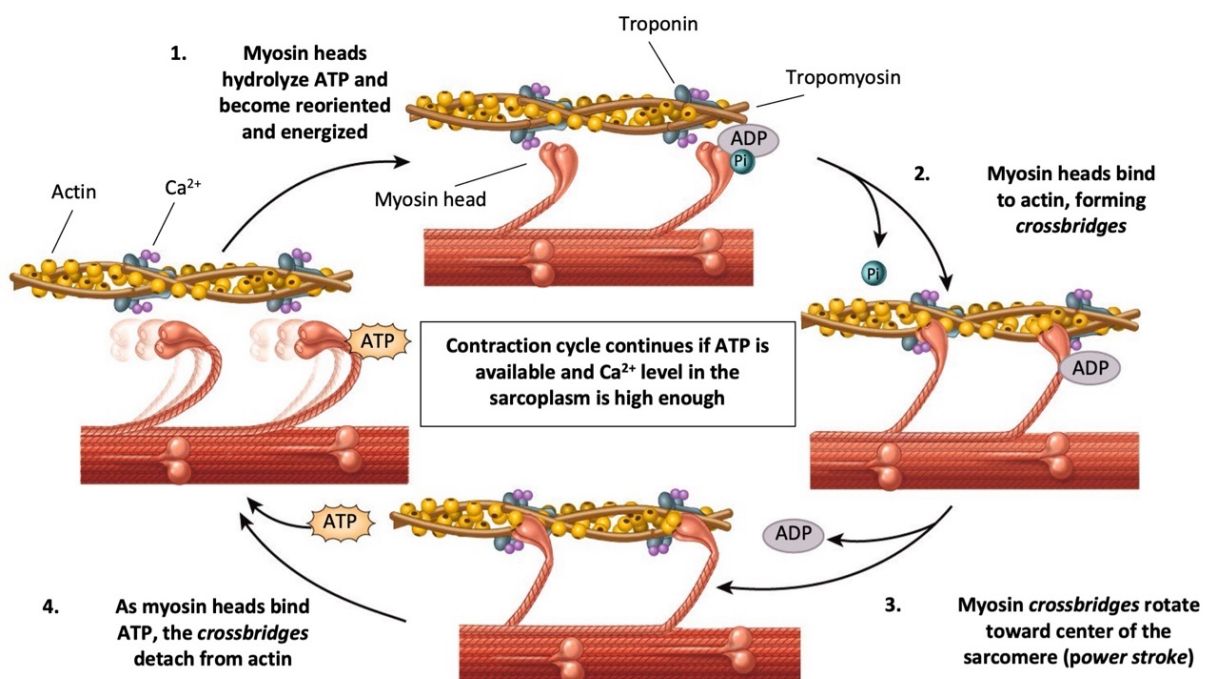


Figura 3: Fases del ciclo de contracción. Adaptada de Tortora & Derrickson, 2013.

1.2.3. Relación longitud-tensión

Durante la contracción muscular, las cabezas de miosina se unen y se deslizan a lo largo de los filamentos delgados, traccionando de ellos y llevándolos hacia la línea M. A medida que los filamentos delgados se desplazan hacia el centro del sarcómero, las bandas I y H se estrechan, llegando a desaparecer en el momento de máxima contracción, aproximando los discos Z entre sí y acortando el sarcómero. Sin embargo, durante este proceso de contracción, la banda A y la longitud de los filamentos gruesos y delgados no sufren cambios (Tortora & Derrickson, 2018).

La capacidad de contracción de los sarcómeros y, por lo tanto, su capacidad para generar fuerza viene determinada por su longitud antes de la contracción. Así, la longitud de los sarcómeros es un reflejo de la superposición existente entre los filamentos gruesos y delgados. En base a este principio, si al inicio de la contracción la longitud de los sarcómeros es muy larga, los filamentos gruesos y delgados casi no podrán superponerse, pudiendo crearse escasos puentes cruzados de actina-miosina. Por el contrario, si la longitud del sarcómero es muy corta, la miosina no podrá encontrar nuevos puntos de unión con la actina. De forma que, la longitud óptima del sarcómero al inicio de la contracción será aquella que permita crear el mayor número de puentes cruzados posibles entre los filamentos gruesos y delgados en un momento determinado, pudiendo generarse así la mayor fuerza de contracción (Silverthorn, 2019).

1.2.4. La unidad motora

La unidad motora es la unidad básica de contracción del músculo esquelético, y está formada por una motoneurona y todas las fibras musculares a las que inerva. Una única motoneurona puede inervar pequeños grupos de fibras, de 3 a 20 fibras (músculos extraoculares, por ejemplo) o grandes grupos de fibras, de 2000 a 3000 fibras musculares (por ejemplo, el músculo gastrocnemio). El número de fibras que forman una unidad motora dependerá de la función del músculo y de los tipos de movimientos que pueda realizar (Huard *et al.*, 2002; Tortora & Derrickson, 2018). Todas las fibras musculares de una unidad motora se contraen simultáneamente ante un potencial de

acción, de forma que la fuerza de contracción dependerá del tamaño de las unidades motoras (número de fibras inervadas) y del número de unidades motoras reclutadas (activadas) en un momento determinado (Tortora & Derrickson, 2018).

Un impulso nervioso generado por una motoneurona es capaz de producir un único potencial de acción en cada una de las fibras musculares a las que estimula, generando una contracción breve y aislada en cada fibra que conforma la unidad motora (*Twitch contraction*). Los potenciales de acción siempre tienen la misma magnitud, de forma que, para generar una fuerza mayor será necesario aumentar el ritmo de llegada de impulsos nerviosos a la unión neuromuscular. Acortando el tiempo transcurrido entre potenciales de acción la fibra muscular no tiene tiempo para relajarse entre estímulos, lo que generará una contracción de mayor magnitud, a este fenómeno se le denomina sumación. Pero si además los potenciales de acción se suceden de forma repetida (alta frecuencia), las fibras musculares reducirán su relajación entre estímulos hasta llegar a una contracción muscular máxima, denominada tetania muscular (**Figura 4**) (Huard *et al.*, 2002; Tortora & Derrickson, 2018; Silverthorn, 2019).

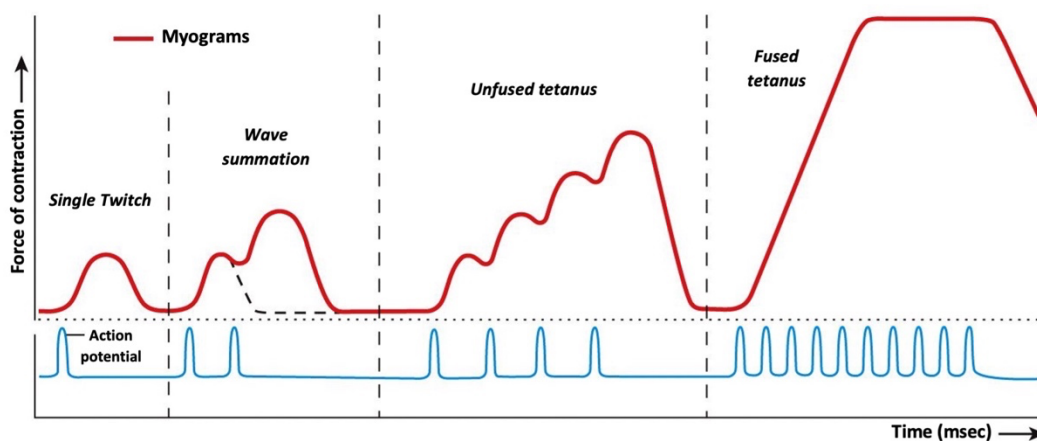


Figura 4: Fuerza de contracción a diferentes frecuencias de estimulación. Adaptada de Tortora & Derrickson (2013).

Tanto la sumación de ondas como la fuerza tetánica se deben, por un lado, a una acumulación de Ca^{2+} mayor a lo habitual en el sarcoplasma, debido a los estímulos consecutivos, y por otro, al estiramiento de los componentes elásticos. Los tendones y el tejido conectivo que conforman el músculo esquelético presentan cierta resistencia

al acortamiento derivado de la contracción muscular, sin embargo, durante la sumación de ondas y contracción tetánica los elementos elásticos no tienen tiempo para recuperar su longitud original y, por lo tanto, reducen su resistencia ante la siguiente contracción, permitiendo que la fuerza de contracción sea mayor que la anterior (Tortora & Derrickson, 2018; Silverthorn, 2019).

1.2.5. Tipos de fibras musculares

El músculo esquelético de los mamíferos es heterogéneo. Las fibras musculares de una misma unidad motora presentan rasgos estructurales y funcionales similares pero no todas las unidades motoras tienen las mismas características. La heterogeneidad de unidades motoras confiere al músculo una alta flexibilidad para realizar tareas muy diferentes y altamente especializadas, como mantener la postura, caminar, saltar, golpear o cambiar de dirección (Schiaffino & Reggiani, 2011). Así, la composición y distribución de las fibras dependerá del patrón de uso de cada músculo (López Chicharro & Fernández Vaquero, 2006). Además, las fibras musculares se caracterizan por su alta plasticidad, es decir, por su capacidad de responder ante cambios hormonales, neuronales y metabólicos (Schiaffino & Reggiani, 2011; Fukada *et al.*, 2020).

Las fibras musculares pueden ser clasificadas de acuerdo con su velocidad de contracción, actividad metabólica (capacidad oxidativa), contenido mitocondrial, contenido de glucógeno, capacidad de almacenamiento de calcio, actividad ATPasa miofibrilar (dependiente de pH), niveles de irrigación, resistencia a la fatiga o por la isoforma de la cadena pesada de la miosina (MHC, *Myosin Heavy Chain*) que expresen (López Chicharro & Fernández Vaquero, 2006; Butler *et al.*, 2021). En base a las diferentes características estructurales y funcionales previamente mencionadas, las fibras musculares de los mamíferos se han clasificado de la siguiente manera (**Tabla 1**):

1.2.5.1 Fibras tipo I

Este tipo de fibras presentan una isoforma de la cadena pesada de la miosina llamada MHC-I. Es el tipo de fibra que más lentamente hidroliza el ATP, es decir, la actividad

ATPasa de la cabeza de la miosina es más lenta que la de los otros tipos de fibras. Es por ello, y por su ciclo de contracción, que son denominadas fibras lentas (López Chicharro & Fernández Vaquero, 2006; Tortora & Derrickson, 2018; Silverthorn, 2019).

Las fibras tipo I cuentan con un menor número de miofibrillas que las fibras tipo II y su línea Z presenta un mayor grosor que la del resto de fibras, además, sus sarcómeros presentan un mayor grado de acortamiento. El RS y los túbulos T de las fibras lentas tienen una menor superficie que se corresponde con una menor frecuencia de transmisión de potenciales de acción (López Chicharro & Fernández Vaquero, 2006; Tortora & Derrickson, 2018; Silverthorn, 2019).

En cuanto a su metabolismo, las fibras tipo I obtienen la mayor parte del ATP a través de metabolismo aeróbico (ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa). Para ello cuentan con una gran red de capilares, que permite un óptimo intercambio gaseoso y de substratos y una adecuada eliminación de deshechos. El metabolismo aeróbico de estas fibras se sustenta gracias a las altas concentraciones de mioglobina y el gran volumen mitocondrial con el que cuentan. Debido a todas las características previamente mencionadas, estas fibras son clasificadas como fibras SO (*Slow-Oxidative*), es decir, fibras de contracción lenta de carácter oxidativo. Son células bien preparadas para ejercicios aeróbicos prolongados y el mantenimiento de la postura (López Chicharro & Fernández Vaquero, 2006; Tortora & Derrickson, 2018; Silverthorn, 2019).

1.2.5.2. Fibras tipo II

Este tipo de fibras tiene una velocidad contráctil de tres a cinco veces mayor que las fibras tipo I, y es por ello que son denominadas fibras rápidas. Las fibras rápidas a su vez se pueden subdividir en tres subgrupos, en función de la isoforma de la MHC que expresen. Así, la velocidad para hidrolizar ATP por parte de la miosina será: mayor en aquellas fibras que expresen la isoforma MHC-2B, intermedia en las fibras que expresen la isoforma MHC-2X y menor en las que presenten la isoforma MHC-2A (López Chicharro & Fernández Vaquero, 2006; Schiaffino *et al.*, 2007; Schiaffino & Reggiani, 2011; Tortora & Derrickson, 2018; Silverthorn, 2019).

Las fibras tipo II cuentan con un RS y unos túbulos T más desarrollados y de mayor superficie y volumen que las fibras de tipo I, permitiéndoles almacenar, liberar y recuperar más rápido el Ca^{2+} y, por consiguiente, producir ciclos de contracción-relajación más rápidos (López Chicharro & Fernández Vaquero, 2006; Tortora & Derrickson, 2018; Silverthorn, 2019).

Las fibras tipo II tienen una alta actividad glucogenolítica y glucolítica, ya que dependen en mayor medida de la glucólisis para obtener energía. Debido a la menor importancia que tienen las vías metabólicas oxidativas en la producción de ATP, este tipo de fibras tiene un menor volumen mitocondrial, menores cantidades de mioglobina y están irrigadas por menos capilares. Los diferentes subtipos de fibras tipo II, también se caracterizan por su metabolismo. Así, las fibras IIA (MHC-2A) tienen un carácter más oxidativo y son denominadas por su carácter metabólico fibras FOG (*Fast Oxidative Glycolytic*), fibras de contracción rápida de carácter oxidativo-glucolítico. Las fibras IIB (MHC-2B), presentan gran actividad anaeróbica y ausencia de actividad oxidativa y son nombradas fibras FG (*Fast Glycolytic*), fibras de contracción rápida glucolíticas no oxidativas (o anaeróbicas). Por último, encontramos con las fibras IIX (MHC-2X), estas fibras presentan un carácter metabólico intermedio entre las fibras tipo IIA y IIB, y debido a esto, reciben el nombre de FIG (*Fast Intermediate Glycolytic*), fibras de contracción rápida glucolíticas-intermedias. Las fibras de contracción rápida presentan una gran capacidad para generar tensión, pero a su vez son más rápidamente fatigables que las fibras SO (López Chicharro & Fernández Vaquero, 2006; Schiaffino *et al.*, 2007; Schiaffino & Reggiani, 2011; Tortora & Derrickson, 2018; Silverthorn, 2019). Cabe destacar la ausencia de las fibras tipo IIB en los humanos, así, las fibras tipo IIX son las que menor actividad oxidativa presentan en el músculo humano (Schiaffino & Reggiani, 2011).

Tabla 1: Tipos y características de las fibras musculares

Fiber type	SO <i>Slow oxidative</i>	FOG <i>Fast oxidative-glycolytic</i>	FIG <i>Fast intermediate-glycolytic</i>	FG <i>Fast glycolytic</i>
Myosin heavy chain (MHC) isoform	MHC I	MHC IIA	MHC IIX	MHC IIB
Twitch time course	Slow	Moderately fast	Fast	Very fast
Power produced	Low	Medium	High	Very high
Fatigue resistance	High	Moderately high	Low	Very low
Endurance	Hours	< 30 min	< few min	< 1 min
Myosin ATPase activity	Low	Moderately high	High	Very high
Oxidative capacity	High	High	Low	Very low
Glycogen content	Low	High	High	High
Myoglobin content	High	Medium to high	Medium to low	Low
Mitochondrial density	High	Medium to high	Medium to low	Low
Capillary density	High	Medium to high	Medium to low	Low
Metabolic activity	Aerobic	Aerobic	Short term aerobic	Mainly anaerobic

(López Chicharro & Fernández Vaquero, 2006; Tortora & Derrickson, 2018; Silverthorn, 2019; Butler *et al.*, 2021)

1.2.6. Reclutamiento de las unidades motoras

La contracción muscular necesita de un reclutamiento progresivo de unidades motoras, de forma que en la medida en la que se va requiriendo más fuerza se van reclutando más unidades motoras. Las unidades motoras son activadas de forma aditiva y siguiendo el siguiente orden: 1) fibras tipo I → 2) fibras tipo IIA → 3) fibras tipo IIX → 4) fibras tipo IIB. El reclutamiento de las fibras tipo II, se lleva a cabo con posterioridad al reclutamiento de las unidades motoras de las fibras tipo I, y son estimuladas para llevar a cabo trabajos de alta intensidad (Kenney *et al.*, 2014).

2. Lesión y regeneración muscular

2.1. Lesiones musculares

2.1.1. Definición y epidemiología de las lesiones musculares

Los trastornos músculo-esqueléticos (fracturas, esguinces, distensiones o enfermedades crónicas), pueden causar dolor y limitación de la movilidad, de la destreza y de la función locomotriz, reduciendo la capacidad para trabajar de las personas, y representan la principal causa de necesidad de rehabilitación en el mundo (WHO, 2021). Según la OMS (Organización Mundial de la Salud) aproximadamente 1.710 millones de personas en el mundo sufre algún tipo de afección músculo-esquelética (WHO, 2021).

Una lesión es definida como un daño, una herida o una pérdida (Tiidus, 2008), más concretamente, una lesión muscular se caracteriza por la disrupción de la estructura normal de las miofibrillas acompañada por una reducción en la producción de fuerza. En el deporte, las lesiones del sistema músculo-esquelético son una de las principales causas de lesión (Järvinen *et al.*, 2014; Hamilton *et al.*, 2015; Edouard *et al.*, 2016), representando el 10-55% del total de las lesiones deportivas (Järvinen *et al.*, 2007; Maffulli *et al.*, 2014). Cabe destacar, que las diferencias anatómicas y fisiológicas pueden influir en que la incidencia y el riesgo de lesión entre hombres y mujeres sea diferente. Así, en deportes como el atletismo las lesiones musculares suponen un 46% en hombres

y un 35% en mujeres del total de las lesiones (Edouard *et al.*, 2016). Los músculos biarticulares son aquellos más susceptibles de sufrir una lesión, es por ello, que los grupos musculares como los isquiotibiales, cuádriceps, abductores y el gastrocnemio son los más frecuentemente lesionados (Malliaropoulos *et al.*, 2011; Mueller-Wohlfahrt *et al.*, 2013; Maffulli *et al.*, 2014; Valle *et al.*, 2018).

2.1.2. Causas y clasificación de las lesiones

Las lesiones musculares pueden ser generadas por causas indirectas, como isquemias o disfunciones neurológicas, o por causas directas que generan una deformación o un traumatismo (Li *et al.*, 2001; Huard *et al.*, 2002). Entre las lesiones causadas por un trauma directo encontramos tres motivos principales de lesión muscular (Li *et al.*, 2001; Huard *et al.*, 2002; Järvinen *et al.*, 2007, 2014; Maffulli *et al.*, 2014; Valle *et al.*, 2018): 1) Laceración: este tipo de lesiones son causadas por impactos contra superficies afiladas o cortantes; 2) Contusión: este tipo de lesiones ocurren cuando el músculo es dañado debido a un golpe o compresión directa (contra un oponente, un objeto, etc.); 3) Distensión: el motivo de estas lesiones son una excesiva fuerza de tensión ejercida, una elongación excesiva sufrida por las miofibrillas musculares (por ejemplo, contracciones excéntricas). Son las dos últimas causas (contusión y distensión), las responsables del 90% de las lesiones musculares en el deporte (Järvinen *et al.*, 2007, 2014), siendo además la unión miotendinosa distal el lugar más común, ya que es el lugar dónde más fuerza se ejerce y se transfiere al músculo (Souza & Gottfried, 2013; Järvinen *et al.*, 2014).

De acuerdo con la severidad clínica que presentan, las lesiones pueden ser clasificadas en diferentes grados. Existen diferentes tipos de clasificaciones y graduaciones (Kujala *et al.*, 1997; Järvinen *et al.*, 2007, 2014; Mueller-Wohlfahrt *et al.*, 2013; Souza & Gottfried, 2013; Pollock *et al.*, 2014; Maffulli *et al.*, 2014); pero ante la falta de unanimidad, en este trabajo se ha decidido seguir la siguiente clasificación para las lesiones musculares: 1) Lesiones de grado I o leves: sólo un pequeño número de fibras presentan distensión o desgarro. La pérdida de integridad estructural, el grado de inflamación y la pérdida de función y/o movilidad son mínimas; 2) Lesiones de grado II

o moderadas: se observa un mayor número de fibras dañadas y una clara pérdida de la función muscular y capacidad contráctil; 3) Lesiones grado III o graves: el daño miofibrilar se extiende por toda la sección transversal del músculo, produciendo una pérdida completa de función muscular (Kujala *et al.*, 1997; Järvinen *et al.*, 2007, 2014; Souza & Gottfried, 2013).

Otro de los aspectos que se consideran en la clínica de las lesiones musculares corresponde al lugar dónde se desarrolla el hematoma. De esta forma, cuando estamos ante un hematoma intramuscular, la sangre extravasada queda dentro de la fascia, la cual se encuentra intacta, generando una presión intramuscular. En estos casos, esta inflamación comprime el sangrado de los vasos sanguíneos limitando la expansión del hematoma. En los casos en los que la fascia se ve dañada, el hematoma se extiende a nivel intermuscular, ocupando los espacios interfasciales e intersticiales, no causando presión intramuscular, pero sí creándose un hematoma de mayor extensión (Kujala *et al.*, 1997; Järvinen *et al.*, 2014).

2.2. Proceso de regeneración muscular

La regeneración muscular es un importante proceso homeostático que permite restablecer la arquitectura de las fibras musculares dañadas tras una lesión y mantener la masa muscular. Es un proceso perfectamente orquestado de eventos celulares y moleculares que se activan secuencialmente con el fin de mantener la estructura y la función muscular (**Figura 5**). Sin embargo, alteraciones en el proceso de regeneración muscular pueden llevar a situaciones fisiopatológicas que afectan a la salud (Forcina *et al.*, 2020).

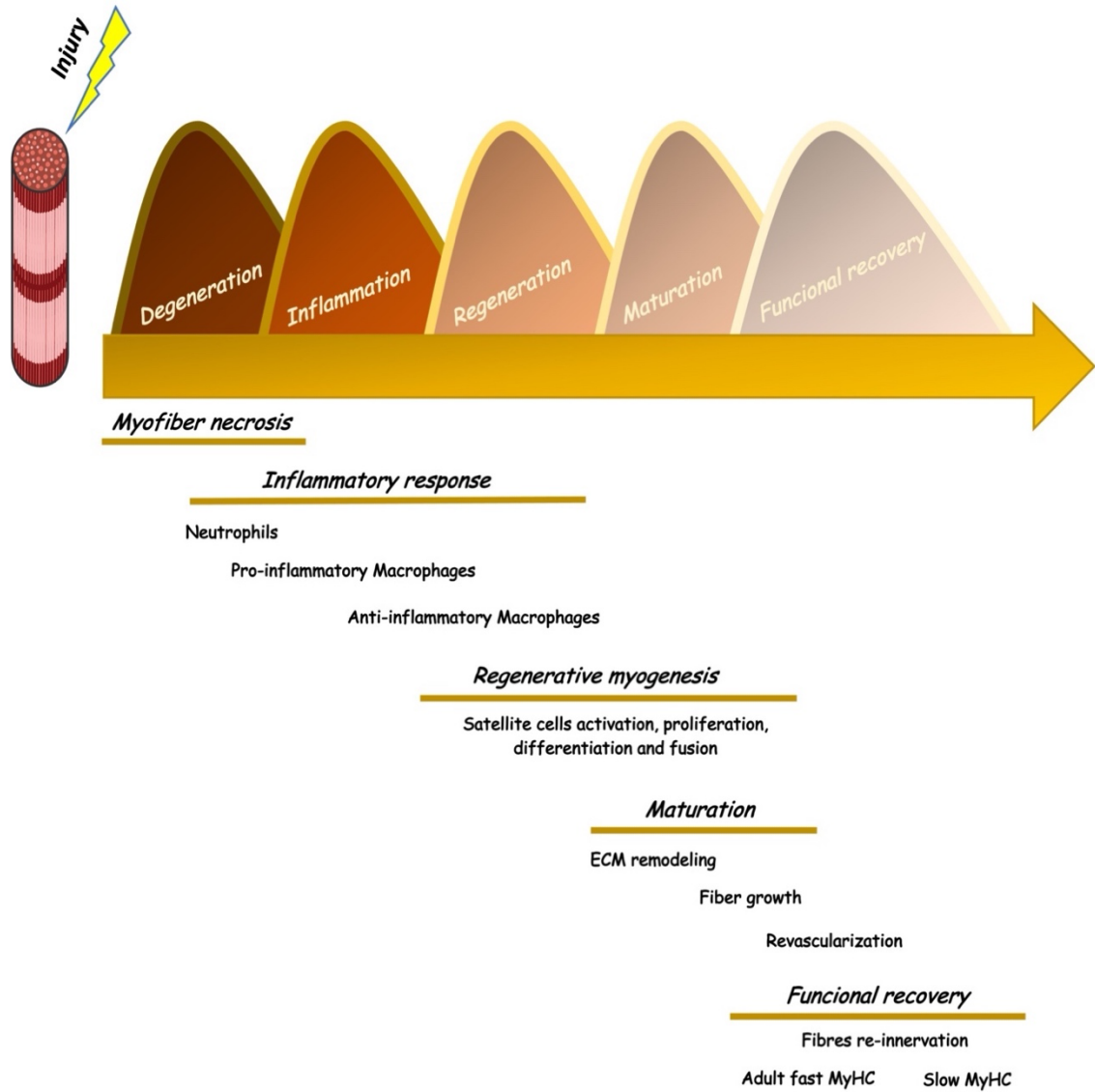


Figura 5: Fases del proceso de regeneración muscular. Basado en Ciciliot & Schiaffino (2010); Laumonier & Menetrey, (2016); Forcina et al. (2020).

2.2.1. Fase de degeneración-necrosis

En una lesión muscular la membrana plasmática y la lámina basal de las fibras musculares suelen verse dañadas, produciéndose un incremento de la permeabilidad de las miofibras. La lesión de la membrana conlleva la alteración de la homeostasis de Ca^{2+} , un flujo iónico descontrolado, una disfunción de los orgánulos y la pérdida de la arquitectura normal de las fibras. Ante el exceso de acumulación de Ca^{2+} extracelular, se activan calpaínas (proteasas dependientes de calcio), caspasas y fosfolipasas que contribuyen a la rápida degradación o necrosis de las miofibrillas y otros orgánulos celulares (Souza & Gottfried, 2013; Laumonier & Menetrey, 2016; Forcina *et al.*, 2020). Para evitar que la necrosis se extienda a lo largo de toda la miofibrilla, tiene lugar la creación de una banda de contracción a modo de “cortafuegos” en los extremos de la lesión. Esta formación condensa proteínas citoesqueléticas con el fin de prevenir la completa destrucción de las miofibrillas y detener la propagación de la necrosis. El espacio lesionado queda así rodeado por las bandas de contracción y suele ser ocupado por el hematoma (Li *et al.*, 2001; Huard *et al.*, 2002; Ciciliot & Schiaffino, 2010; Turner & Badylak, 2012; Järvinen *et al.*, 2014; Laumonier & Menetrey, 2016; Forcina *et al.*, 2020).

La alteración del sarcolema de las miofibras provoca que proteínas musculares como la creatina quinasa (CK), lactato deshidrogenasa (LDH) y troponina puedan encontrarse en el plasma, sirviendo como biomarcadores de daño muscular (Chargé & Rudnicki, 2004; Souza & Gottfried, 2013; Forcina *et al.*, 2020).

2.2.2. Fase inflamatoria

Las lesiones suelen dañar los vasos sanguíneos musculares, provocando, debido a la alta vascularización del tejido, la formación de hematomas. Los vasos sanguíneos, a su vez, sirven como señalizadores, a través de la liberación de citoquinas, para atraer leucocitos del torrente sanguíneo. Además, la materia intracelular liberada al espacio extracelular tras la ruptura de la membrana plasmática también ejerce como elemento señalizador (DAMPs, *Damage-Associated Molecular Patterns*), activando respuestas inflamatorias (Souza & Gottfried, 2013).

Los neutrófilos son las primeras células inflamatorias mieloides en llegar al lugar de la lesión (1-6 h post-lesión), alcanzando su pico de invasión a las 12-24 h posteriores a la lesión (Chargé & Rudnicki, 2004; Laumonier & Menetrey, 2016; Forcina *et al.*, 2020). Los neutrófilos son necesarios para eliminar los restos miofibrilares y secretan grandes cantidades de citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas y factores de crecimiento, con el fin de crear un microambiente quimioatrayente para otras células inflamatorias como los macrófagos (Laumonier & Menetrey, 2016; Forcina *et al.*, 2020). La actividad fagocítica de los neutrófilos, a su vez, produce una gran secreción de radicales libres en el lugar de la lesión. Estas especies reactivas pueden agravar la respuesta inflamatoria y crear un daño secundario en las fibras sanas adyacentes (Li *et al.*, 2001; Souza & Gottfried, 2013; Forcina *et al.*, 2020).

Tras el descenso de la población de neutrófilos, los macrófagos se convierten en las células inflamatorias predominantes, pudiendo llegar desde los capilares cercanos al sitio de la lesión o desde el epimisio y/o perimisio (Souza & Gottfried, 2013). Se han identificado dos subpoblaciones de macrófagos que participan en la regeneración muscular: los macrófagos M1 o macrófagos pro-inflamatorios (CD68⁺) y los macrófagos M2 o anti-inflamatorios (CD163⁺). Los macrófagos M1 actúan durante las primeras horas tras la lesión (24-48 h) y participan en la lisis y eliminación de miofibrillas dañadas (fagocitosis del tejido necrótico), pero, además, secretan citoquinas pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF- α , *Tumor Necrosis Factor α*) y la interleuquina β 1 (IL- β 1), y estimulan la proliferación de mioblastos. Los macrófagos M2 aparecen entre los días 2 y 4 tras la lesión muscular, atenúan el proceso inflamatorio secretando citoquinas anti-inflamatorias, como la interleuquina-10 (IL-10), y ayudan al proceso de reparación muscular promoviendo la proliferación, diferenciación y fusión de células satélite, la síntesis de proteínas miofibrilares y, por lo tanto, favorecen la formación de nuevos miotubos (Ciciliot & Schiaffino, 2010; Turner & Badylak, 2012; Laumonier & Menetrey, 2016; Dueweke *et al.*, 2017; Forcina *et al.*, 2020).

Un gran número de agentes celulares presentes en la zona de la lesión, entre ellos los neutrófilos, los macrófagos, los mastocitos (Forcina *et al.*, 2020) y los linfocitos T (Huard *et al.*, 2002; Souza & Gottfried, 2013) son los encargados de secretar moléculas pro-

inflamatorias como TNF- α e interferón- γ (IFN- γ), interleuquinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-1 β), factores de crecimiento, como por ejemplo, el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, *Fibroblast Growth Factor*), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, *Hepatocyte Growth Factor*), factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1, *Insulin-like Growth Factor 1*), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*), el factor de crecimiento transformable beta-1 (TGF- β 1, *Transforming Growth Factor β 1*), y moléculas de adhesión (selectinas [P-selectina, L-selectina y E-selectina]), las cuales regularán la proliferación y diferenciación de mioblastos, jugando un papel fundamental en la futura reparación muscular (Li *et al.*, 2001; Huard *et al.*, 2002; Laumonier & Menetrey, 2016; Forcina *et al.*, 2020).

2.2.3. Fase de regeneración muscular

En humanos la fase de regeneración suele tener lugar los primeros 4-5 días post-lesión, alcanzando su pico a las 2 semanas, momento a partir del cual su actividad va reduciéndose progresivamente hasta las semanas 3-4 post-lesión. En esta fase, las fibras dañadas ya necrotizadas son reemplazadas por fibras de nueva formación, que emanan entre el tejido conectivo cicatricial (Huard *et al.*, 2002; Järvinen *et al.*, 2014; Laumonier & Menetrey, 2016).

Las fibras musculares son células post-mitóticas, de forma que no tienen la capacidad de dividirse (Laumonier & Menetrey, 2016), es por ello, que son las células miogénicas del músculo esquelético, las células satélite musculares (MuSC, *Muscle Satellite Cells*), las principales responsables de la reconstrucción del músculo esquelético. Las MuSC se encuentran en un estado quiescente entre la lámina basal y el sarcolema de las miofibras y son activadas por diferentes factores de crecimiento y citoquinas para el crecimiento postnatal del músculo y la regeneración muscular (Souza & Gottfried, 2013; Forcina *et al.*, 2020).

La característica principal de las MuSC es su capacidad de auto-renovación, gracias a esto el número de MuSC tras los procesos de regeneración y/o crecimiento muscular se mantiene, pudiendo garantizarse un reservorio suficiente de estas para su futuro uso.

Las MuSC tienen la capacidad de dividirse simétricamente, dando lugar a la creación de dos hijas idénticas, que pueden permanecer quiescentes o proliferar y diferenciarse miogénicamente. Además, también pueden dividirse asimétricamente, de manera que cada MuSC generará una hermana: una será $PAX7^+/MyoD^-$ (*Paired box7/Myoblast determination protein 1*), de forma que permanecerá quiescente, mientras que la otra será $Pax7^-/MyoD^+/Myf5^+$ (*Paired box7/Myoblast determination protein/Myogenic regulatory factor 5*), y por lo tanto, podrá comenzar la diferenciación miogénica (Forcina *et al.*, 2020). El ciclo de las MuSC es controlado por un complejo sistema de regulación en el que participan tanto factores intrínsecos como extrínsecos (Shadrin *et al.*, 2016; Laumonier & Menetrey, 2016).

En una lesión muscular no se activan exclusivamente las MuSC del lugar dañado, sino que se activan todas las células satélite presentes a lo largo de toda la longitud de la fibra muscular, provocando la proliferación y migración de las MuSC al lugar del daño y redistribuyendo las células progenitoras a lo largo de toda la miofibra (Chargé & Rudnicki, 2004; Shadrin *et al.*, 2016). Una vez activadas, las MuSC proliferan y se diferencian formando miocitos, estos últimos se podrán fusionar con las miofibras existentes, reparar las fibras dañadas o fusionarse entre ellos para dar lugar a nuevos miotubos multinucleados (**Figura 6**) (Li *et al.*, 2001; Forcina *et al.*, 2020). La proliferación de las MuSC está regulada por factores de crecimiento, mientras que la diferenciación es regulada por factores miogénicos (MRFs, *Myogenic Regulatory Factors*) como Myf5, MyoD, miogenina y MRF4 (Fu *et al.*, 2015). La regeneración muscular requiere de un proceso coordinado en el que están perfectamente reguladas la activación, proliferación y migración celular, y el reconocimiento y la adhesión, para garantizar un eficaz proceso de fusión (Forcina *et al.*, 2020). El éxito de este proceso repercutirá sobre la recuperación total de la función muscular (Laumonier & Menetrey, 2016).

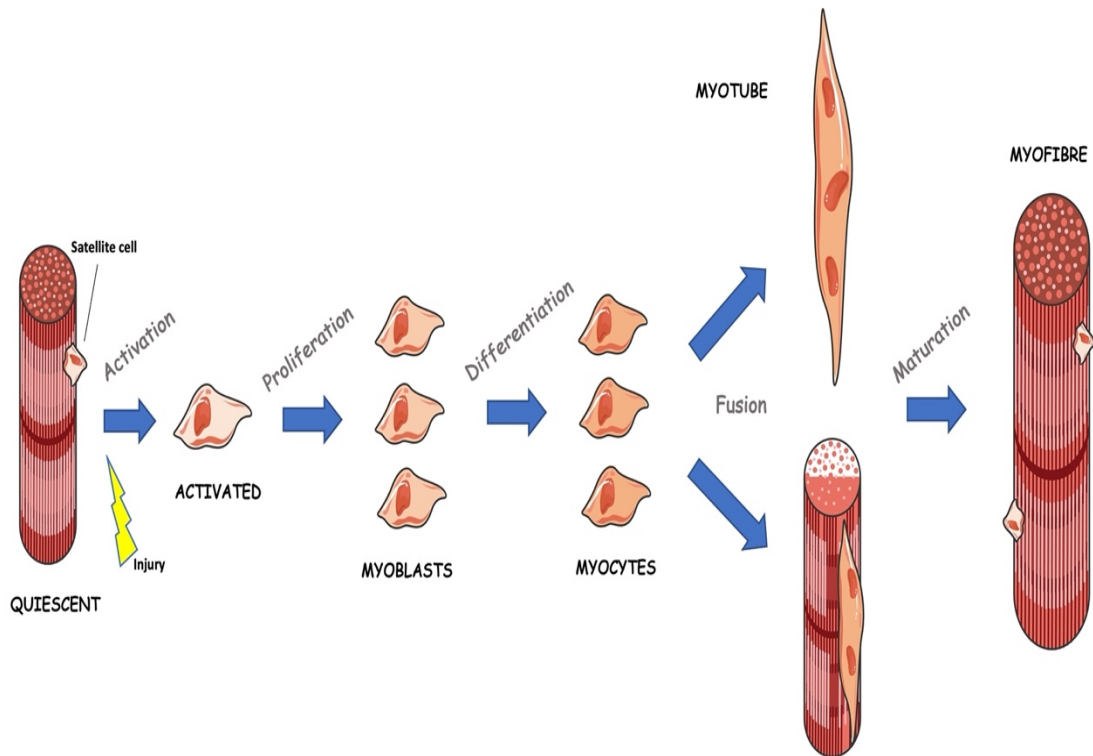


Figura 6: Miogénesis del tejido muscular adulto durante la regeneración muscular. Basada en le Moal *et al.* (2017).

En el proceso de regeneración muscular pueden participar otras células madre, más allá de las propias células madre musculares, como las células progenitoras endoteliales, las células madre intersticiales, células madre derivadas de la médula ósea y progenitores fibroadipogénicos (Forcina *et al.*, 2020).

2.2.4. Fase de remodelación y maduración

La última fase de la regeneración muscular consiste en la regeneración y maduración de las fibras dañadas, la formación y remodelación de la ECM, la revascularización del tejido, la reinervación de las fibras musculares y la recuperación de la función muscular. Esta última fase en humanos tiene lugar alrededor de la segunda semana y decrece paulatinamente a la semana 3-4 post-lesión (Souza & Gottfried, 2013; Järvinen *et al.*, 2014; Shadrin *et al.*, 2016).

2.2.5. Remodelación de la matriz extracelular

Junto con la formación de nuevas fibras musculares tiene lugar la deposición de tejido conectivo o ECM. Así, en una reparación fisiológica, la deposición de tejido conectivo y el crecimiento de nuevas fibras están equilibrados. Los fibroblastos tienen un papel fundamental en la reparación del tejido muscular, ya que ayudan a la reparación de las miofibras dañadas, pero además segregan proteínas de la ECM como colágeno I y III, fibronectina, elastina, proteoglicanos, glucoproteínas, laminina y factores de crecimiento (Li *et al.*, 2001; Souza & Gottfried, 2013). En los primeros estadios del proceso de reparación, la deposición de tejido conectivo ejerce de puente de unión, ocupando el lugar de los trozos de fibras musculares ausentes, y mantiene la arquitectura general del músculo, además, sirve de sustento para las células infiltrantes, ayuda a preservar la capacidad de transducción de fuerza a lo largo del músculo y ejerce de protección en el lugar de la lesión (Li *et al.*, 2001; Turner & Badylak, 2012; Souza & Gottfried, 2013; Laumonier & Menetrey, 2016; Forcina *et al.*, 2020). Pero un exceso de acumulación de fibroblastos puede causar un aumento en la deposición de colágeno, lo cual dificultará la difusión de nutrientes a las miofibras y la migración y fusión de miofiblastos, produciendo la formación del denominado tejido cicatricial o fibrosis en el lugar de la lesión. La fibrosis se caracteriza por la acumulación excesiva de matriz extracelular, sobre todo colágeno tipo I, dificultando la completa recuperación funcional del músculo (reducción de fuerza y/o elasticidad) (Li *et al.*, 2001; Laumonier & Menetrey, 2016; Forcina *et al.*, 2020). El factor de crecimiento TGF- β 1 es el mayor estimulador de los procesos fibróticos, ya que es un precursor de la conversión de miofiblastos en miofibroblastos y de la deposición de colágeno I/III, laminina y fibronectina (Souza & Gottfried, 2013; Laumonier & Menetrey, 2016).

2.2.6. Vascularización

En las lesiones musculares la red vascular suele en muchas de las ocasiones verse dañada, produciéndose una hipoxia en el lugar de la lesión. Es por ello, que la rápida formación de nuevos capilares en el lugar de la lesión es imprescindible para garantizar una exitosa regeneración y una recuperación funcional completa. Un proceso de

revascularización incompleto conducirá a una fibrosis excesiva. El factor de crecimiento VEGF ha sido caracterizado como uno de los más importantes factores angiogénicos que mejoran la recuperación muscular tras una lesión (Laumonier & Menetrey, 2016).

2.2.7. Innervación

Se puede considerar que una completa recuperación muscular tiene lugar cuando las miofibras están completamente regeneradas y son inervadas. Dentro de las 2-3 primeras semanas post-lesión tiene lugar la creación de la unión neuromuscular, lo cual es esencial para llevarse a cabo en las últimas fases del proceso de regeneración el crecimiento y maduración de las fibras y la recuperación de la función. De no ocurrir esta conexión neuromuscular las nuevas fibras sufrirán un proceso atrófico (Järvinen *et al.*, 2007; Ciciliot & Schiaffino, 2010; Turner & Badylak, 2012; Laumonier & Menetrey, 2016; Forcina *et al.*, 2020). Las fibras de nueva formación expresan en las primeras fases una miosina típica de la etapa de desarrollo (MHC embrionaria y/o neonatal). La transformación de un fenotipo de MHC de desarrollo a un fenotipo adulto se puede llevar a cabo sin inervación, pero la inervación de la fibra sí que será necesaria para que las fibras de nueva formación que expresen MHC-II puedan hacer el cambio natural hacia unas fibras MHC-I (Ciciliot & Schiaffino, 2010).

2.3. Re-injury

Las lesiones tipo II y III (moderadas-severas) en muchas ocasiones generan atrofia persistente. También es muy común encontrar tras estas lesiones la acumulación de tejido cicatricial y una reducción de la funcionalidad del músculo. Los músculos con lesiones de estas características son más susceptibles de sufrir una lesión consecutiva en el mismo lugar, la cual se traducirá en una todavía mayor atrofia y fibrosis.

En el ámbito deportivo, una lesión previa se considera como uno de los factores de mayor riesgo para sufrir una nueva lesión en el mismo músculo (Hägglund *et al.*, 2006). Se considera que, por ejemplo en el ámbito del fútbol, un 7-31% de los músculos lesionados por tensión acaban sufriendo una lesión recurrente en el mismo lugar

(Warren *et al.*, 2010; Malliaropoulos *et al.*, 2011; Souza and Gottfried, 2013). Además, la mayoría de las relesiones tienen lugar dentro de los primeros 4 meses tras la vuelta a la actividad (Warren *et al.*, 2010; Malliaropoulos *et al.*, 2011). De forma que, muchas de las lesiones recurrentes pueden ser atribuibles a la incompleta recuperación de la lesión (Hägglund *et al.*, 2006).

2.4. Terapias

El objetivo de las terapias utilizadas en la medicina deportiva es obtener una óptima reparación del tejido muscular, reduciendo la fibrosis y mejorando la funcionalidad muscular, de forma que se eviten lesiones recurrentes en el mismo lugar. Los tratamientos aplicados a las lesiones musculares habitualmente están orientados a reducir el dolor, disminuir la inflamación y el hinchazón en la fase aguda y recuperar el rango de movimiento y la fuerza en las fases más avanzadas (Dueweke *et al.*, 2017). Pese a que el proceso de regeneración muscular ha sido ampliamente estudiado y caracterizado debido a la gran incidencia de las lesiones y a su importancia clínica, no existe todavía la tan ansiada *gold therapy*, ni suficientes evidencias o estudios que nos ayuden a mejorar sustancialmente la recuperación de las lesiones musculares. La dificultad en la búsqueda de tratamientos que mejoren la regeneración muscular podría ser atribuible a la heterogeneidad del tipo de lesión (lugar y severidad).

El principal tratamiento que se aplica ante las lesiones musculares es el conocido y clásico RICE (*Rest, Ice, Compression, Elevation*). Las evidencias científicas parecen avalarlo como un tratamiento conservador óptimo para el manejo de la sintomatología aguda y que no influye negativamente en el proceso de regeneración (Järvinen *et al.*, 2013). Junto a esto, la movilización temprana del músculo con el fin de darle elasticidad al tejido cicatricial, los tratamientos mecánicos (masajes) que mejoran la inflamación y el aporte sanguíneo, y el uso de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos, para el manejo del dolor y el control de la inflamación, parecen ser los tratamientos más habituales (Ciciliot & Schiaffino, 2010; Järvinen *et al.*, 2014; Laumonier & Menetrey, 2016).

Más allá de los tratamientos más conservadores, los ultrasonidos (Järvinen *et al.*, 2014; Dueweke *et al.*, 2017), el plasma rico en plaquetas (*Platelet-rich plasma*) (Contreras-Muñoz *et al.*, 2017; Dueweke *et al.*, 2017), la terapia con ultrasonidos, la oxigenoterapia (*hyperbaric oxygen therapy*) (Järvinen *et al.*, 2014), los factores de crecimiento (Li *et al.*, 2001; Huard *et al.*, 2002; Laumonier & Menetrey, 2016), la terapia génica (relacionada con factores de crecimiento) (Huard *et al.*, 2002), las terapias con antifibróticos (inhibidores de la expresión TGF-β1) (Huard *et al.*, 2002; Laumonier & Menetrey, 2016) y el uso de células madre (Shadrin *et al.*, 2016; Laumonier & Menetrey, 2016; Contreras-Muñoz *et al.*, 2021), han sido y están siendo en la actualidad utilizados y estudiados con el fin de mejorar el proceso de regeneración muscular.

3. Regulación de la masa y de la regeneración muscular

Debido a su gran masa y al alto porcentaje que representa respecto a la masa corporal total, la modulación del estado metabólico del tejido muscular tendrá un gran impacto sobre la homeostasis de energía a nivel sistémico (Albert & Hall, 2015; Kjøbsted *et al.*, 2018). Gracias a su gran plasticidad, el músculo esquelético tiene la capacidad de estar en continuo cambio, produciéndose así constantes variaciones en la abundancia y la actividad de las proteínas musculares. La regulación de la masa muscular, así como del tamaño de las fibras, viene determinada por el equilibrio entre síntesis y degradación de proteínas y acreción y degradación de mionúcleos, es decir, la masa muscular es un reflejo del *turnover* proteico y del *turnover* celular (Sandri *et al.*, 2013; Schiaffino *et al.*, 2013). Los cambios estarán gobernados por diferentes vías metabólicas que producirán la activación y supresión de diferentes vías de señalización (Kjøbsted *et al.*, 2018) (**Figura 7**). Ante alteraciones en aspectos como la perfusión y la PO₂ (presión parcial de oxígeno) muscular, el estado redox, la dinámica de Ca²⁺ o la renovación de ATP, la homeostasis del músculo puede verse comprometida, dando lugar a respuestas intracelulares de señalización (Kjøbsted *et al.*, 2018).

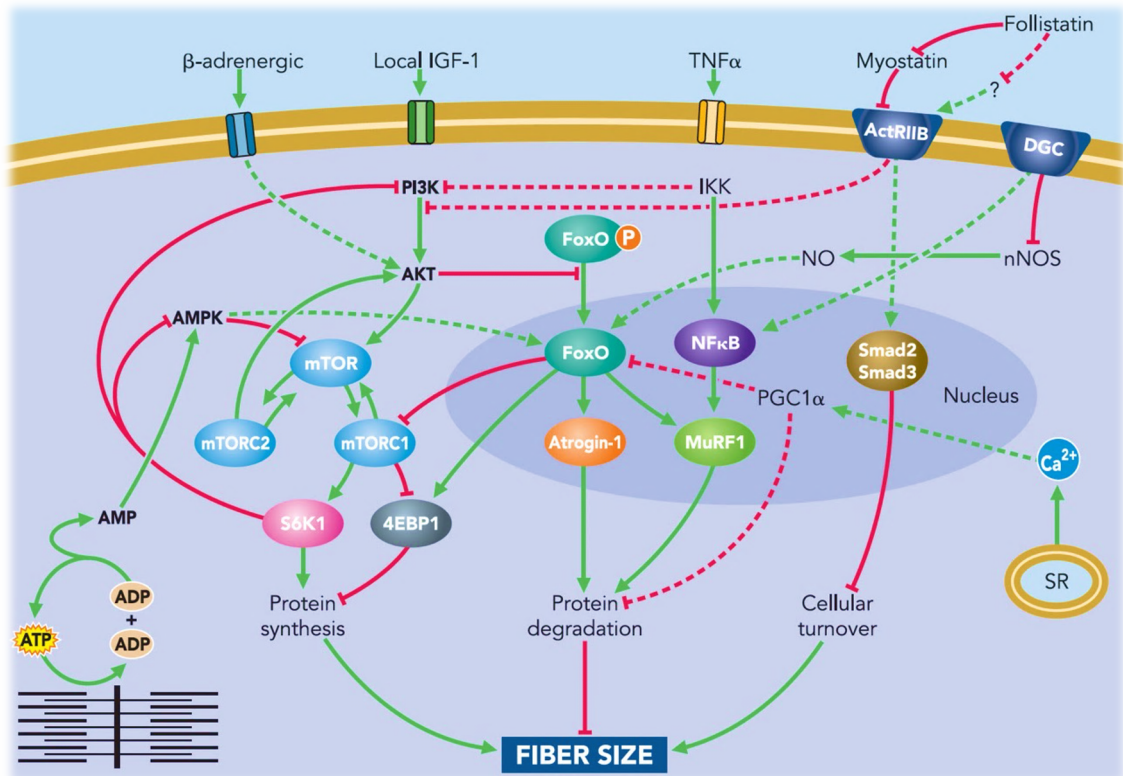


Figura 7: Esquema de las principales vías de señalización muscular involucradas en la regulación del tamaño de las fibras. Extraída de Sandri *et al.* (2013).

3.1. AMPK

La proteína quinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK, *Adenosine Monophosphate-activated Kinase*) ha sido descrita como el principal sensor intracelular del estado energético. Esta quinasa regula las vías anabólicas y catabólicas con el fin de mantener las reservas energéticas, y asegurar así un óptimo balance entre el gasto y consumo de energía (Kjøbsted *et al.*, 2018). AMPK es activada en aquellas situaciones en las que los cocientes ADP/ATP y AMP/ATP intracelulares se ven incrementados, de forma que cualquier alteración en la generación/consumo de ATP incrementará los niveles de AMP y activará AMPK (Freyssenet, 2007; Kjøbsted *et al.*, 2018). La activación aguda de AMPK promueve el transporte de glucosa y la oxidación de ácidos grasos, mientras que suprime la actividad de la glucógeno sintasa y la síntesis de proteínas (vía inhibición de la fosforilación (Ser 2448) de mTOR), regulando de forma negativa la hipertrofia muscular (Kjøbsted *et al.*, 2018; Thomson, 2018). Durante su activación crónica incrementa la capacidad oxidativa del músculo a través de la estimulación de la biogénesis mitocondrial mediante PGC-1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor*

gamma coactivator 1 α) y el factor de respiración nuclear 1 (NRF-1, *Nuclear Respiratory Factor*) (Freyssenet, 2007; Kjøbsted *et al.*, 2018). La involucración de AMPK en la autofagia, en respuesta al déficit calórico, al ejercicio, a la hipoxia y a otros factores estresantes ha sido bien descrita (Mantovani & Roy, 2011; Kjøbsted *et al.*, 2018).

3.1.1. AMPK y regeneración muscular

Durante el proceso de regeneración muscular las células musculares interactúan con otros tipos de células, como las células del sistema inmunitario. El proceso inflamatorio que envuelve la regeneración muscular está perfectamente regulado, dando lugar en las primeras fases a la secreción de compuestos pro-inflamatorios por parte de los macrófagos, mientras que, durante la fase final del proceso inflamatorio los macrófagos presentan un perfil anti-inflamatorio que facilitará la miogénesis. Esta transición de fase pro-inflamatoria a anti-inflamatoria es crucial para que una óptima regeneración muscular pueda tener lugar, y requiere de unos tiempos determinados para asegurar una recuperación del equilibrio homeostático al final del proceso (Kjøbsted *et al.*, 2018; McArthur *et al.*, 2020). Se ha observado que la activación de AMPK α 1 en los macrófagos está asociada con una reducción en la respuesta inflamatoria, debido a la participación AMPK α 1 en la transición de los macrófagos de un fenotipo pro- hacia uno anti-inflamatorio (Mounier *et al.*, 2013; Kjøbsted *et al.*, 2018; McArthur *et al.*, 2020). Además, la forma fosforilada de AMPK está asociada con el trabajo de fagocitosis de tejido necrótico por parte de los macrófagos (post-lesión) (Mounier *et al.*, 2013). Pese a que todavía se desconoce el mecanismo exacto mediante el cual AMPK influye en el cambio fenotípico de los macrófagos, se especula que los cambios en la actividad inflamatoria de las células del sistema inmunitario podrían deberse a cambios en su estado metabólico, aunque sin conocerse a ciencia cierta el origen y la modulación de dichos cambios (Mounier *et al.*, 2013; McArthur *et al.*, 2020). Parece no haber dudas sobre el papel de AMPK α 1 en el cambio hacia un fenotipo anti-inflamatorio de los macrófagos pero, sin embargo, sí que existen discrepancias sobre los efectos que esta modulación pueda tener sobre la aceleración o mejora de la regeneración muscular. Así, McArthur *et al.* (2020) consideran en un trabajo reciente que la modulación de los macrófagos hacia un fenotipo anti-inflamatorio promoverá la

diferenciación miogénica y la fusión, y por ende posibilitará una completa reparación del tejido (McArthur *et al.*, 2020). Sin embargo, otros trabajos, pese a observar el importante rol de AMPK en la modulación del proceso inflamatorio, no han podido identificar mejoras en parámetros miogénicos, aunque no descartan el posible papel de AMPK sobre las miofibras en las fases tardías de la regeneración muscular (Mounier *et al.*, 2013).

El metabolismo energético puede regular la homeostasis y determinar el estado de las MuSC (Theret *et al.*, 2017). Las células satélite presentan en su estado quiescente una gran capacidad oxidativa mitocondrial y una baja capacidad glucolítica en comparación con su estado activo, en el cual presentan un metabolismo predominantemente basado en la glucólisis. De hecho, ya durante su activación temprana parece ser el metabolismo glucolítico el que tiene un mayor peso respecto al oxidativo (Freyssenet, 2007; Fu *et al.*, 2015; Theret *et al.*, 2017). La vuelta de las MuSC a un estado quiescente puede modularse por medio de variaciones en su metabolismo vía AMPK α 1, que inducirá cambios de un metabolismo basado en la glucólisis hacia uno basado en la fosforilación oxidativa (Theret *et al.*, 2017). En este sentido, cabe destacar la necesidad de un óptimo balance entre la renovación y la diferenciación de las MuSC, ya que la primera es necesaria para mantener las reservas de las MuSC, mientras que la diferenciación es necesaria para la formación de nuevas miofibras (Theret *et al.*, 2017). Una de las características de las MuSC parece ser su capacidad de resistencia ante la exposición a ambientes hipóxicos, donde tienen la capacidad de reducir su actividad metabólica y adoptar un estado más quiescente/durmiente para hacer frente a situaciones de gran estrés (Theret *et al.*, 2017).

Estudios previos han podido comprobar como una reducción en la actividad de AMPK α 1 en las células satélite o en ratones AMPK α 1 *knockout* implica una reducción en la capacidad de proliferación y diferenciación de las células satélite e incrementos en la fibrogénesis durante regeneración muscular (Fu *et al.*, 2015). A pesar del importante papel de AMPK α 1 en el incremento de las MuSc en estado quiescente y en la mejora de la proliferación y diferenciación de las células satélite, su sobreexpresión por encima de valores fisiológicos no parece mejorar la regeneración muscular (Fu *et al.*, 2015).

Además, una activación crónica de AMPK produce los ya mencionados efectos deletéreos sobre la masa muscular (Fu *et al.*, 2015).

3.2. Vía de señalización de Akt/mTOR

La vía de señalización *insulin-like growth factor 1-phosphoinositide-3-kinase-Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin* (IGF1-PI3K-Akt/PKB-mTOR) es una de las principales vías de regulación de la hipertrofia muscular, regulada principalmente por factores de crecimiento, la actividad mecánica y la insulina (Blaauw *et al.*, 2009; Schiaffino *et al.*, 2013).

La proteína mTOR es considerada la reguladora central del crecimiento y metabolismo de las células eucariotas (Albert & Hall, 2015). Esta quinasa, mediante la interacción con otras proteínas, forma dos complejos mTORC1 y mTORC2. El complejo mTORC1 es activado por nutrientes, factores de crecimiento y situaciones de alta disponibilidad de energía celular, es decir, en situaciones energéticamente favorables (Albert & Hall, 2015). Los dos mayores efectores que a partir de mTORC1 se encargan de la regulación de la síntesis de proteínas musculares son 4E-BP (*Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein*) y p70S6K (*p70 Ribosomal protein S6 kinase*), mientras que, el factor regulado por mTORC1 ULK1 (*Autophagy activating kinase 1*) modulará los procesos autofágicos en el músculo (Albert & Hall, 2015). mTORC1 regula de forma positiva procesos anabólicos como la síntesis de proteínas, biogénesis ribosomal, transcripción, síntesis lipídica, biosíntesis de nucleótidos y metabolismo, y a su vez, inhibe procesos catabólicos como la autofagia. Por otro lado, mTORC2 controla la remodelación del citoesqueleto y el metabolismo y supervivencia celular (Albert & Hall, 2015; Rion *et al.*, 2019). Mientras que factores como Akt, la actividad mecánica muscular y los nutrientes, como los aminoácidos, activan mTOR, AMPK se presenta como inhibidora de la actividad de mTOR (Schiaffino & Reggiani, 2011; Schiaffino *et al.*, 2013).

Cuando Akt es activada, numerosas proteínas diana modulan diferentes procesos celulares como la síntesis de proteínas, supervivencia celular, ciclo celular, metabolismo,

y catabolismo de proteínas (Blaauw *et al.*, 2009). Akt participa como señalizadora en el proceso de síntesis de proteínas y crecimiento muscular por medio de la estimulación de mTOR (Schiaffino *et al.*, 2013), a la vez que inhibe las vías de degradación de proteínas, como las gobernadas por factores de transcripción como FoxO (*Forkhead*), encargado de regular las vías de degradación ubiquitina-proteasoma y autofagia-lisosoma (Blaauw *et al.*, 2009; Sandri *et al.*, 2013; Schiaffino *et al.*, 2013).

La homeostasis muscular y el balance síntesis-degradación no es tan simple como una ecuación lineal. El proceso de hipertrofia del músculo esquelético no es exclusivamente el resultado de un incremento de síntesis de proteínas, si no que es un proceso que deberá ir también acompañado por un descenso en la degradación de proteínas (Schiaffino *et al.*, 2013).

3.2.1. Vía Akt/mTOR y regeneración muscular

Las vías de señalización involucradas en la síntesis de proteínas, como es el caso de la vía Akt/mTOR, se activan y adquieren un rol importante durante la regeneración muscular debido, entre otros motivos, a la necesidad de sintetizar grandes cantidades de proteína para asegurar la reparación muscular (Liu *et al.*, 2018). Trabajos previos han recogido el papel fundamental que juega mTOR en la activación, proliferación y diferenciación de las MuSC, ya que sin su presencia el proceso de regeneración muscular se vería negativamente alterado, como así se ha podido observar con la reducción de la expresión de Myf5, MyoD y miogenina en mioblastos mTOR *knockout* (Zhang *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2019). Además, se requiere de la activación de la vía mTORC1-p70S6K para la fusión de los mioblastos y, por consiguiente, para garantizar la formación de nuevas miofibras (Wei *et al.*, 2019). En las últimas fases del proceso de regeneración, el crecimiento de las fibras de nueva formación estará supeditado a la presencia de la actividad de mTOR (Wei *et al.*, 2019).

4. Exposición a ambientes estresantes

4.1. Altitud e hipoxia hipobárica

Se estima que aproximadamente 200 millones de personas en el mundo viven por encima de los 2.500 m de altitud (Moore *et al.*, 1998; Luks *et al.*, 2021; WHO, 2021) y que miles de personas se exponen diariamente por razones laborales o de ocio a la altura. Las principales respuestas anatómicas, bioquímicas, clínicas y fisiológicas a la altura tienen lugar a elevaciones superiores a los 2.500-3.000 m, es decir, a la denominada gran altitud (Luks *et al.*, 2021).

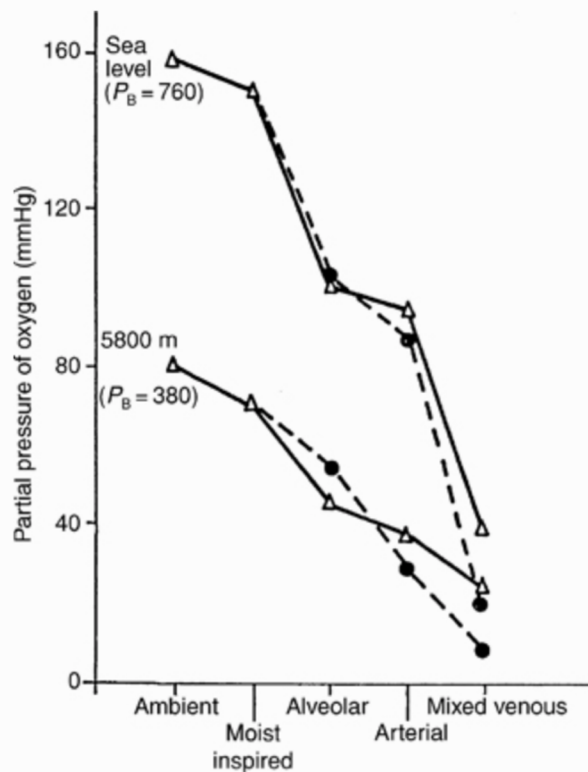


Figura 8: Esquema representativo de la cascada de oxígeno a nivel del mar y a 5.800 m. PB, presión barométrica; triángulo blanco, reposo; círculo negro, ejercicio máximo. Extraída de Luks *et al.* (2021).

Al proceso en el cual la presión parcial de oxígeno (PO_2) cae desde el aire atmosférico hasta llegar a la matriz mitocondrial se le denomina cascada de oxígeno. La PO_2 disminuye en cada paso o escalón de esta cascada en la que el oxígeno se difunde desde la atmósfera hasta los tejidos (**Figura 8**). Así, por ejemplo, a nivel del mar la PO_2 del aire

atmosférico es de 160 mmHg (20.9% O₂), la de la sangre arterial es de ~100 mmHg (que sería equivalente a 13% O₂), mientras que, a nivel muscular es de aproximadamente 27-30 mmHg (representando tan sólo al 4% O₂ atmosférico) (Carreau *et al.*, 2011; Favier *et al.*, 2015; Chaillou & Lanner, 2016). La presión barométrica disminuye a medida que se incrementa la altitud, lo que se traduce en una reducción de la PO₂ atmosférica (hipoxia hipobárica), pero sin verse afectado el porcentaje de oxígeno en el aire (20.9%) (Moore *et al.*, 1998; Favier *et al.*, 2015). Considerando esto, en altura la reducción de la PO₂ atmosférico, supondrá una reducción de la PO₂ arterial y por consiguiente también una disminución de la disponibilidad de oxígeno (O₂) a nivel tisular (hipoxemia) (**Figura 8**) (Moore *et al.*, 1998; Semenza, 1998).

Todas las células de los mamíferos son sensibles a los cambios en las presiones parciales de O₂, y responden con el fin de crear los cambios funcionales y/o estructurales necesarios para hacer frente a las alteraciones que la hipoxia pueda causar en ellas (Semenza, 1998; Navarrete-Opazo & Mitchell, 2014). La detección de los cambios en la disponibilidad de O₂ puede ocurrir a diferentes niveles, produciéndose o bien respuestas agudas o bien respuestas crónicas, pero estas estarán siempre directamente relacionadas con la dosis de hipoxia (Navarrete-Opazo & Mitchell, 2014). Además, la severidad de la hipoxemia, la duración de la exposición y la frecuencia, serán los factores que determinarán que las respuestas sean beneficiosas o patológicas (hormesis) (Navarrete-Opazo & Mitchell, 2014). Asimismo, aspectos como el tipo hipoxia (nomobárica vs hipobárica), factores interindividuales y el grado de aclimatación, también jugarán un papel fundamental en las respuestas fisio-patológicas a la altitud (Luks *et al.*, 2021).

Los quimiorreceptores periféricos (carotídeos y aórticos) son unos de los principales sensores de la PO₂. Ante una hipoxia sistémica, estos transmitirán señales al sistema nervioso central mediante los nervios aferentes para generar respuestas como el incremento de la ventilación, de la frecuencia cardiaca y del gasto cardiaco, con el fin de incrementar la captación pulmonar de O₂ y aumentar su liberación a nivel tisular. El riñón es otro de los principales sensores de hipoxemia. La corteza yuxtamedular cuenta con células peritubulares e intersticiales especializadas (células sensibles a la hipoxia)

que responden ante la hipoxia produciendo y secretando al torrente sanguíneo eritropoyetina (EPO), la cual se unirá a las células progenitoras de eritrocitos e inducirá su supervivencia, proliferación y diferenciación (Semenza, 2009; Wenger & Hoogewijs, 2010). La señalización por parte de los quimiorreceptores periféricos se lleva a cabo en cuestión de segundos y es muy sensible a cualquier reducción de la PO_2 , mientras que, las respuestas celulares como la eritropoyesis, necesitan mayores reducciones en la PO_2 y de mayor tiempo para efectuarse (de minutos a horas) (Prabhakar, 2006; Semenza, 2009) (**Figura 9**).

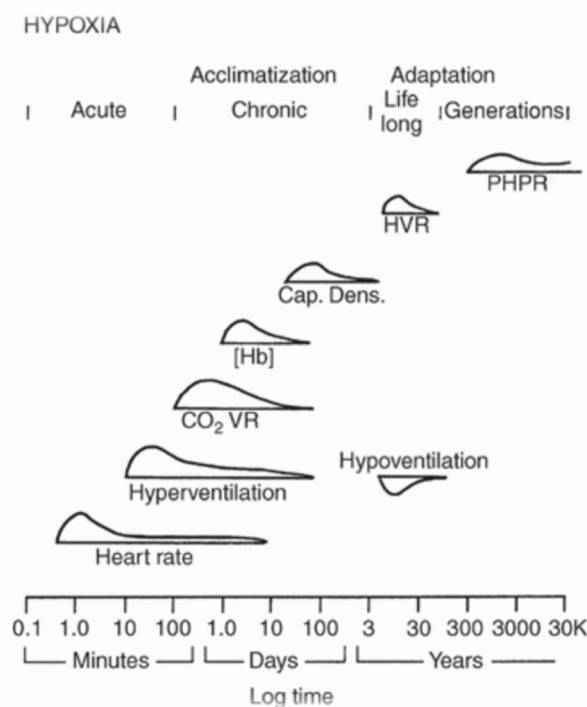


Figura 9: Respuestas de aclimatación y adaptativas a la hipoxia a lo largo del tiempo. Extraída de Luks *et al.* (2021).

El organismo puede verse expuesto a situaciones de baja disponibilidad de O_2 en diferentes situaciones. Así, además de la disminución en la tensión de O_2 producida por la exposición a la altura, en situaciones fisiológicas como la embriogénesis o el ejercicio físico, o debido a patologías como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad arterial periférica, la apnea obstructiva del sueño o en situaciones de isquemia, las células pueden verse privadas de un aporte oxígeno óptimo (Chaillou & Lanner, 2016).

4.1.1. Aclimatación a la altitud y respuestas a corto plazo

La aclimatación se define como la suma de diferentes respuestas beneficiosas, en respuesta a la hipoxia provocada por la altitud, que tienen lugar tras un periodo en altura y que desaparecen cuando se vuelve a nivel del mar (Luks *et al.*, 2021). La aclimatación persigue compensar la caída de la PO_2 en el proceso de transporte de O_2 desde la atmósfera hasta los tejidos (cascada de oxígeno). Sin embargo, incluso en las mejores aclimataciones nunca se consigue restaurar la PO_2 tisular (o arterial) a valores de nivel del mar (Luks *et al.*, 2021). Mediante la aclimatación, entre otras cosas, se intenta proteger al organismo contra enfermedades de altura como el mal agudo de montaña, el edema pulmonar de altura o el edema cerebral de altura, se intenta preservar el rendimiento cognitivo y se busca sostener la capacidad submáxima de rendimiento (Luks *et al.*, 2021).

Las respuestas más importantes durante la aclimatación a la altura son las cardiorespiratorias, así como los cambios hematológicos que tienen lugar a partir de las primeras horas. Estas respuestas se extienden a lo largo de los primeros días favoreciendo la tendencia a la normalización de la PO_2 arterial (Luks *et al.*, 2021). La aclimatación ventilatoria a la altitud se caracteriza por un incremento de la ventilación, aumentando así la PO_2 arterial y la saturación arterial de oxígeno; y por un descenso de la presión parcial de dióxido de carbono (CO_2) y la normalización del pH arterial. Gracias a la normalización de la PO_2 arterial a través de las adaptaciones respiratorias, la frecuencia cardiaca y el gasto cardiaco, que son incrementados en la fase aguda de la exposición a la altura, regresan a sus valores basales (**Figura 9**) (Muza *et al.*, 2010).

La exposición a la hipoxia causa durante las primeras horas-días, un incremento de la diuresis, de la contracción esplénica y de la pérdida de agua por evapotranspiración asociada a la hiperventilación. Todo ello contribuye a una reducción del volumen plasmático y, por consiguiente, una hemoconcentración que incrementará la concentración de hemoglobina y glóbulos rojos en sangre y mejorará el transporte de oxígeno (Luks *et al.*, 2021).

4.1.2. Respuestas a la altura a largo plazo

El mecanismo molecular implicado en las respuestas genéticas a la hipoxia es el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1, *Hipoxia-Inducible Factor 1*) (Wang *et al.*, 1995). HIF-1 cuenta con dos subunidades, una inducible por hipoxia (HIF-1 α) y otra constitutivamente expresada HIF-1 β (Wang *et al.*, 1995). HIF-1 β se mantiene a niveles constantes independientemente de los niveles de O₂, sin embargo, HIF-1 α cuenta con una corta vida y es regulado por la presencia de O₂. En normoxia, HIF-1 α es rápidamente degradado, vía ubiquitina-proteasoma (Salceda & Caro, 1997), sin embargo, en hipoxia HIF-1 α es estabilizado, se acumula y transloca del citoplasma al núcleo, dónde dimeriza con HIF-1 β convirtiéndose en una molécula transcripcionalmente activa (Semenza, 2009). Considerando que prácticamente todas las células de los mamíferos son sensibles a los cambios de PO₂, no es de extrañar que se hayan identificado más de 100 genes regulados por HIF-1. Entre muchos otros, HIF-1 regula genes implicados en la eritropoyesis y el metabolismo del hierro, en la angiogénesis, en el tono vascular, en el metabolismo de la ECM, en el metabolismo de la glucosa, en la proliferación y supervivencia celular y en la apoptosis (Ke & Costa, 2006).

4.1.3. Hipoxia intermitente

La hipoxia intermitente se caracteriza por la alternancia de periodos en hipoxia con periodos en normoxia (Neubauer, 2001). Los protocolos de hipoxia intermitente usados como “herramienta” en busca de algún tipo de respuesta o beneficio son muy variados en cuanto a la duración, severidad y frecuencia de exposición a los diferentes niveles de oxígeno. Sea cual sea el protocolo aplicado, mediante la intermitencia se persigue un efecto similar al principio de sobrecompensación del entrenamiento deportivo. De forma que el organismo es sometido a un estímulo estresante (lo suficientemente grande como para crear respuestas, pero no tan severo como para causar daños irreparables) durante un periodo de tiempo limitado, y es posteriormente devuelto a su situación de *confort* o recuperación, con el fin de generar en él una respuesta acumulativa que empezará con la primera exposición. La respuesta acumulativa permitirá al organismo mejorar la extracción de O₂ y optimizar los procesos metabólicos

para su utilización, con el fin de prepararse y adaptarse ante una posible futura exposición a la hipoxia (Neubauer, 2001).

Un óptimo protocolo de hipoxia intermitente, el cual provea al organismo de una dosis de hipoxia adecuada, puede generar respuestas beneficiosas como las recogidas por Viscor *et al.* (2018), entre las que se encuentran: incrementos de la eritropoyesis y mejora de la capacidad aeróbica, mejoras en la capilarización y metabolismo muscular, control de la hipertensión, aceleración de la reparación tisular, mejoras en la patología del asma, modulación del síndrome metabólico y mejoras en la aclimatación a la altitud.

Otro de los objetivos que se persigue mediante la exposición intermitente es evitar los posibles efectos deletéreos que la hipoxia crónica produce sobre el organismo. Y es que la exposición crónica a gran altitud está estrechamente relacionada con la anorexia de altura (pérdida del apetito y de masa corporal y muscular), disfunciones cognitivas y alteraciones del sueño, entre otras (Luks *et al.*, 2021).

4.1.4. El músculo esquelético y la hipoxia

Las células son las consumidoras últimas de O₂. En el caso de las células musculares, el O₂ atmosférico llega hasta los capilares musculares y de ahí es difundido hasta la mitocondria, mientras que el CO₂, realiza el viaje en sentido contrario. En situación de hipoxia, un balance alterado de la demanda O₂/suministro O₂ puede producir una inadecuada disponibilidad de O₂ a nivel muscular (Lundby *et al.*, 2009). Considerando que en reposo la masa muscular consume un 20-30% de la tasa metabólica total y que el 90% de la energía producida por las células musculares proviene de vías aeróbicas, es fácil pensar que la homeostasis del tejido muscular pueda verse afectada por la disminución del aporte de O₂ (Favier *et al.*, 2015). Sin embargo, la hipoxia parece afectar de forma leve a la PO₂ intramuscular, siendo el ejercicio físico un estímulo aparentemente más desafiante para el músculo (Lundby *et al.*, 2009; Favier *et al.*, 2015).

El músculo esquelético presenta niveles de expresión de HIF-1 α elevados de forma fisiológica, de manera que no se puede descartar la posibilidad de que HIF-1 α tenga un

papel importante en la homeostasis del músculo (Lundby *et al.*, 2009). Estudios previos han constatado que HIF-1 α se ve vagamente modificado en humanos durante exposiciones a la altitud (9 días, 4.500 m), cuestionando el posible papel de HIF-1 α en respuesta a la hipoxia a nivel muscular (Viganò *et al.*, 2008).

En cuanto a la masa muscular, ha sido ampliamente demostrado que la hipoxia crónica tiende a causar una reducciones en la masa muscular, junto con reducciones de la sección transversal de las fibras (FCSA, *Fibre-Cross Sectional Area*). Además, al igual que en otras respuestas adaptativas, existe una correlación positiva entre la severidad de la hipoxia y la atrofia muscular. Es un hecho que a partir de los 5.000 m de altitud el musculo esquelético humano sufre un proceso catabólico (Favier *et al.*, 2015).

El tejido muscular cuenta con una amplia red capilar, es un tejido muy bien irrigado. Los capilares son los encargados de difundir el O₂ desde la red vascular a las mitocondrias, y por lo tanto, despierta un gran interés el papel que estos puedan jugar en situaciones de baja disponibilidad de oxígeno. Ha sido ampliamente reportado que la exposición a la hipoxia incrementa la densidad capilar (CD) tanto en humanos como en otros vertebrados. Sin embargo, las evidencias indican que este incremento en la capilaridad tras la exposición pasiva a la hipoxia viene determinado por una reducción de la FCSA, es decir, por una atrofia de las fibras, y no por una neoformación de capilares (Favier *et al.*, 2015; Rizo-Roca *et al.*, 2018; Luks *et al.*, 2021). Es decir, para una determinada área del músculo el número de capilares será mayor, pero debido a que el número de fibras en esa área determinada también lo es (menor tamaño de las fibras implica un mayor número de fibras para un área determinada), de esta forma nos encontraremos con una CD mayor, pero, sin embargo, el cociente capilares/fibra (C/F) se mantendrá constante. Igualmente, la respuesta observada no siempre es así, y es que la angiogénesis en un músculo expuesto a la hipoxia depende de aspectos como la actividad del músculo, el tipo de músculo, el tipo de fibras del que está compuesto, el tiempo de exposición, etc. (Deveci *et al.*, 2001a, 2002).

Los diferentes efectos que la hipoxia tiene sobre las enzimas musculares, así como sobre la masa mitocondrial también han sido objeto de estudio a lo largo del tiempo.

Parece que animales y humanos responden de forma diferente, y es que, en animales se han reportado incrementos en el número de mitocondrias tras la exposición a la altitud, sin verse alteraciones en el tamaño de estas (Rizo-Roca *et al.*, 2017a; Luks *et al.*, 2021), mientras que, en el caso de los humanos, la exposición a la hipoxia parece generalmente reducir la densidad mitocondrial (Hoppeler & Vogt, 2001). Sin embargo, la severidad de la altitud, así como el tiempo de exposición, parecen ser determinantes a la hora de inducir cambios significativos en la densidad mitocondrial (Luks *et al.*, 2021). En cuanto al metabolismo energético de las fibras musculares sometidas a hipoxia hipobárica, este también parece ser dependiente de la dosis de hipoxia (Navarrete-Opazo & Mitchell, 2014). Así, dependiendo de la severidad de la hipoxia y del tiempo de exposición, pueden producirse tanto incrementos como reducciones en las enzimas oxidantes (Hoppeler *et al.*, 2003; Favier *et al.*, 2015; Luks *et al.*, 2021).

Pese a que muchos de los cambios previamente mencionados puedan llevarnos a pensar que la hipoxia produce efectos adversos sobre el tejido muscular, hay que destacar que todos estos cambios estructurales y metabólicos están destinados a una optimización metabólica, y producirán adaptaciones que ayudarán a hacer frente a futuras situaciones en las que la PO₂ muscular pueda verse comprometido (Favier *et al.*, 2015).

4.1.5. Hipoxia y regeneración muscular

Las MuSC responsables del proceso de regeneración en el músculo adulto residen de forma fisiológica en un microambiente hipóxico (Beaudry *et al.*, 2016; Dünnwald *et al.*, 2019) e incluso se piensa que HIF-1 α podría ser necesario para la formación de células progenitoras miogénicas (Beaudry *et al.*, 2016). Pese a ello, las MuSC también se ven negativamente reguladas por la hipoxia, y un reducido aporte de oxígeno puede modular su renovación, proliferación y diferenciación (Simon & Keith, 2008). Pocos trabajos previos han puesto la mirada en el efecto de la hipoxia en los procesos de regeneración del músculo esquelético. En los escasos trabajos llevados a cabo *in vivo*, los resultados parecen indicar que la hipoxia hipobárica crónica podría provocar un efecto negativo sobre la activación de las células satélite (Chaillou *et al.*, 2014) y

diferenciación de los mioblastos (debido a una reducción de la presencia de MyoD y miogenina en las primeras fases) (Chaillou *et al.*, 2014; Jash & Adhya, 2015). Además de ralentizar la formación y crecimiento de nuevas miofibras, pero sin comprometer la recuperación final de la lesión (Chaillou *et al.*, 2014). En cuanto a los trabajos llevados a cabo *in vitro*, se ha observado que la hipoxia severa (1% O₂) produce una sobrerregulación de Pax7 y promueve la auto-renovación de las células satélite. Así, bajo hipoxia, aumenta la división simétrica de las células satélite y el número de células en estado quiescente. Además, en estudios realizados en cultivos celulares en situaciones de baja disponibilidad de oxígeno se ha visto que aumenta la proliferación celular y se inhibe la diferenciación de mioblastos (Liu *et al.*, 2012; Jash & Adhya, 2015; Beaudry *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017).

Sin embargo, los estudios previos realizados han pasado por alto aspectos histológicos y funcionales que puedan indicar el efecto real de la hipoxia sobre la recuperación muscular.

4.2. El frío

4.2.1. Homeotermia y regulación de la temperatura

La principal característica de los animales homeotermos, como las aves y los mamíferos, es la capacidad de mantener la temperatura corporal interna estable dentro de unos estrechos rangos, independientemente de las fluctuaciones térmicas del ambiente externo, gracias a su capacidad de producir calor de forma endógena (endotermia) (Rezende & Bacigalupe, 2015). Incluso en condiciones de reposo, termoneutralidad y post-absorción, los animales tienen un metabolismo basal, o una producción de calor basal, fruto de los procesos metabólicos necesarios para mantener el organismo vivo (Roberts, 2011). El calor liberado en las reacciones metabólicas será igual al metabolismo oxidativo total, es decir, al consumo de oxígeno (Hohtola, 2004). Sin embargo, la pérdida de calor en los animales homeotermos es constante, esta transferencia de calor desde el organismo hacia el exterior tiene lugar a través de los fenómenos de radiación, convección, conducción y evaporación (Butler *et al.*, 2021). Por

lo tanto, el mantenimiento de la temperatura interna derivará del balance entre la pérdida y la producción de calor.

Ante la exposición a un ambiente frío, los mamíferos sufren cambios comportamentales y fisiológicos dirigidos a reducir la pérdida de calor e incrementar la generación de calor (Ravussin *et al.*, 2014). La regulación de la temperatura corporal en los mamíferos es llevada a cabo mediante la integración de la información procedente de sensores periféricos y centrales. Entre los receptores periféricos se encuentran los receptores de frío, situados bajo la epidermis, y los receptores de calor, situados en la dermis. Por su parte, el sistema nervioso central cuenta con neuronas termosensibles, que en el caso de los mamíferos están situadas en el hipotálamo y en la médula espinal (Butler *et al.*, 2021). La termosensibilidad de las neuronas hipotalámicas presenta cierta plasticidad ante los ciclos de estrógenos, de forma que la temperatura central de las mujeres puede variar más de 0.7°C según la fase del ciclo menstrual. Además, junto con las variaciones de temperatura relacionadas con los ciclos hormonales, un reducido flujo sanguíneo cutáneo y una reducida respuesta de tiriteo, hacen que diferentes aspectos deban considerarse en la termorregulación de las mujeres (Stocks *et al.*, 2004).

4.2.2. Respuesta de termogénesis

Ante una disminución de la temperatura, el primer objetivo de los homeotermos es reducir la pérdida de calor. Para ello, se produce la respuesta autónoma de vasoconstricción periférica que reduce el flujo de sangre hacia la piel y extremidades, derivando la sangre hacia el núcleo corporal y produciendo un incremento de la presión arterial, gasto cardiaco y volumen sistólico y un aumento de la frecuencia cardiaca (Deveci *et al.*, 2001b; Stocks *et al.*, 2004; Templeman *et al.*, 2010; Maekawa *et al.*, 2013). Sin embargo, cuando la disipación de calor excede a la producción metabólica de calor, se tiene que producir una termogénesis activa, destinada a aumentar la producción de calor interno. Esta termogénesis activa implicará un aumento del consumo de O₂ por parte de los animales (Deveci *et al.*, 2001b).

La primera respuesta al frío para incrementar la producción de calor metabólico es la *shivering thermogenesis (ST)* o termogénesis basada en el tiriteo. El tiriteo es el resultado de pequeñas contracciones musculares, involuntarias y asincrónicas, durante las cuales la energía metabólica es liberada en forma calor, y es llevado a cabo principalmente por los músculos del tronco y de las piernas. La intensidad de la ST dependerá del número de músculos reclutados, y supondrá un aumento del consumo de O₂ por parte de los músculos, pudiendo llegar a multiplicarse el metabolismo por 5 o 6 durante un tiriteo intenso (Deveci *et al.*, 2001b; Schaeffer *et al.*, 2003). En animales no aclimatados al frío, la ST es rápidamente activada ante reducciones de la temperatura, sin embargo, en animales aclimatados la ST es parcialmente reemplazada por la *non-shivering thermogenesis (NST)* (Stocks *et al.*, 2004; Roberts, 2011).

La respuesta metabólica al frío aumenta a través de la NST o la termogénesis no basada en el tiriteo. La producción de calor a través de la NST tiene lugar principalmente en el tejido adiposo pardo o marrón (BAT, *Brown Adipose Tissue*), de hecho, éste es el único tejido del organismo diseñado exclusivamente para la producción de calor (Butler *et al.*, 2021). El BAT, es un tejido especializado que se halla exclusivamente en los mamíferos euterianos y su presencia es mayor en animales hibernadores y pequeños, así como en recién nacidos, pero igualmente es metabólicamente activo en animales de mayor tamaño y en humanos adultos (Butler *et al.*, 2021). El sistema nervioso simpático mediante la liberación de noradrenalina activa la proteína desacopladora 1 (UCP-1, *Uncoupling protein-1*), encargada desde su localización en la membrana mitocondrial de la oxidación de sustratos metabólicos para la generación de calor (Deveci & Egginton, 2002; Butler *et al.*, 2021). La NST puede incrementar la tasa metabólica basal 3 o 4 veces en animales de pequeño tamaño, pero su aportación en la termogénesis es mínima en mamíferos de gran tamaño (>10 kg), siendo todavía el tejido muscular el órgano más relevante en la NST en los grandes animales (Roberts, 2011).

4.2.3. Músculo esquelético y frío

El músculo esquelético es el principal responsable de llevar a cabo la ST. El hecho de ser el tejido más abundante del organismo conlleva que albergue el mayor número de

mitocondrias, y de ahí su gran capacidad para la producción de calor (Schaeffer *et al.*, 2003). Durante las exposiciones crónicas al frío, sobre todo en mamíferos de pequeño tamaño, la NST es la principal fuente de calor, pero incluso aun teniendo un papel secundario, el tejido muscular también participa en la termogénesis, prueba de ello es que durante la NST el músculo esquelético aumenta su consumo de oxígeno alrededor de un 10% (Schaeffer *et al.*, 2003) y experimenta respuestas adaptativas. La termogénesis en el tejido muscular se sostiene gracias a la mejora del metabolismo oxidativo, que tiene lugar a través de incrementos en la capilaridad (Suzuki *et al.*, 1997) y aumentos en los niveles de mioglobina, UCP-3, PGC1- α y PPARs (*Peroxisome Activated Proliferator Receptors*) y en el contenido mitocondrial (Egginton, 2002; Stancic *et al.*, 2013; Mizunoya *et al.*, 2014). La oxidación de lípidos es la principal fuente energética durante la termogénesis, pero estos no pueden sustituir por completo a la glucosa como fuente de energía, siendo así, que durante la termogénesis tanto el uso de ácidos grasos como el consumo de glucosa se ven elevados (Vallerand *et al.*, 1990; Stancic *et al.*, 2013; Sepa-Kishi *et al.*, 2017). Las bases moleculares establecidas en la adaptación muscular al frío se mantienen desde el principio hasta el final de la aclimatación térmica, demostrando que la actividad muscular se extiende más allá de la mera participación en la ST y que participa activamente en la regulación de la homeostasis de todo el organismo (Stancic *et al.*, 2013).

El frío puede suponer un factor estresante para el organismo, debido a ello, durante las exposiciones prolongadas se producen pérdidas de masa muscular y atrofia de las fibras musculares. El incremento de las hormonas estresantes circulantes (hormona tiroidea y glucocorticoides) puede ser parcialmente una de las causas de esta atrofia muscular (Egginton *et al.*, 2001; Mizunoya *et al.*, 2014).

4.2.4. Frío y regeneración muscular

La crioterapia, o terapia de frío, ha sido ampliamente utilizada para tratar lesiones, dolores crónicos, espasmos musculares, edemas, daño muscular causado por ejercicio y/o procesos inflamatorios (Malanga *et al.*, 2015). El principio de la aplicación del frío se basa en reducir el calor corporal o de una zona en concreto, con la finalidad de reducir

el flujo sanguíneo mediante el reflejo de vasoconstricción. La reducción del flujo sanguíneo, además de reducir el metabolismo y el consumo de oxígeno, ayudará a controlar el edema y ralentizará la liberación de factores inflamatorios (Nadler *et al.*, 2004; Malanga *et al.*, 2015). Así, tras una lesión muscular mediante la crioterapia se busca reducir el dolor, el hinchazón, la degeneración y la inflamación (Vieira Ramos *et al.*, 2016; Shibaguchi *et al.*, 2019).

Los efectos de la crioterapia local han sido muy discutidos, no existe consistencia en los resultados sobre si su aplicación favorece o no la recuperación tras el daño muscular. El amplio espectro de protocolos usados y la heterogeneidad en la localización y severidad de las lesiones, no ayuda a obtener evidencias concluyentes, pero, a día de hoy, su aplicación en la clínica es ampliamente utilizada. Los resultados de algunos estudios muestran que la crioterapia aplicada de forma intermitente (30 min, cada 2 horas) puede reducir la respuesta inflamatoria a través de la reducción de la infiltración de macrófagos y de la acumulación de TNF- α , NF- κ B (*Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*), TGF- β y metaloproteasas en los primeros días post-lesión, pero sin producir cambios en el área de la lesión o en la fibrosis, es decir, ayuda al proceso inflamatorio sin alterar el proceso de regeneración (Shibaguchi *et al.*, 2016). Sin embargo, en contraposición, otros resultados parecen indicar que la crioterapia no produce alteraciones en la actividad de los macrófagos, pero que retarda la aparición y desaparición de factores de crecimiento como TGF- β 1, promoviendo la acumulación excesiva de colágeno y retardando de forma leve la recuperación de la isoforma de la miosina post-lesión, mientras que no influye en la actividad (proliferación y diferenciación) de las células satélite (Shibaguchi *et al.*, 2016).

En los últimos años, se ha extendido el uso de nuevas terapias basadas en la utilización del frío para la recuperación del daño muscular post-ejercicio, en este caso las diferentes estrategias usadas se basan en someter a todo el cuerpo al estímulo estresante. La inmersión en agua fría (CWI, *Cold Water Immersion*), es una de las estrategias usadas para acelerar la recuperación tras el ejercicio. Los principios y objetivos de este tratamiento son idénticos a los descritos en la aplicación de frío local, así, se ha visto que el uso de CWI tras cada entrenamiento durante varias semanas,

disminuye el riesgo de lesiones musculares y reduce las reacciones inflamatorias (da Costa Santos *et al.*, 2019). La aplicación de CWI, incluso durante cortos periodos (5 días) es capaz de regular la respuesta anti-inflamatoria y reducir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*), mejorando el balance *redox* e incrementando la viabilidad celular. A pesar de que los resultados obtenidos parecen otorgar un buen pronóstico al uso de la CWI en la recuperación del daño muscular producido por ejercicio (Furtado *et al.* 2018), no existen suficientes estudios ni análisis exhaustivos que puedan asegurar su eficacia. La crioterapia de cuerpo entero (WBCT, *Whole Body Cryotherapy Therapy*), basada en exposiciones a temperaturas extremas (entre -100°C y -140°C) durante un corto periodo (2-3 min), parece ofrecer resultados muy similares a los previamente mencionados en la CWI. Y es que, la aplicación de WBCT facilita la recuperación gracias a la reducción del proceso inflamatorio post-ejercicio (Banfi *et al.*, 2010; Pournot *et al.*, 2011; Ziemann *et al.*, 2012; Mila-Kierzenkowska *et al.*, 2013; Bouzigon *et al.*, 2016; Lombardi *et al.*, 2017).

4.3. La hipoxia hipobárica y el frío

En las últimas décadas la hipoxia ha sido ampliamente estudiada y utilizada bien como herramienta terapéutica, bien como método de entrenamiento para la mejora del rendimiento deportivo. Gracias a ello, se cuenta con una extensa bibliografía que recoge las diferentes respuestas del organismo a la hipoxia y la adaptación de los animales a ambientes de baja disponibilidad de oxígeno. En la gran mayoría de los estudios publicados, la adaptación a la altura se entiende como la adaptación a ambientes hipóxicos, sin considerar otros factores ambientales que acompañan a la hipoxia en la altitud como pueden ser el frío, la escasa humedad o la excesiva radiación (Banchemo *et al.*, 1985; Luks *et al.*, 2021).

El frío es un elemento ambiental que siempre acompaña a la hipoxia hipobárica en la biosfera, de hecho, a cualquier latitud la temperatura cae aproximadamente un 1°C por cada incremento de 150 m en altura (*lapse rate*). Debido a este hecho, no sería extraño pensar que la coexistencia de ambos factores haya podido marcar las adaptaciones genéticas a lo largo de la evolución. Las cosas así, este podría ser uno de los motivos por

los que muchas adaptaciones fisiológicas observadas en el medio natural o en residentes de gran altitud, no se hayan encontrado posteriormente en estudios realizados en laboratorio, en los que la hipoxia ha sido el único factor contemplado.

La coexistencia del frío y la hipoxia en el ambiente, desde una perspectiva fisiológica, es un reto para el organismo. Durante la exposición a la hipoxia el organismo sufre una reducción de la disponibilidad de oxígeno a nivel tisular, mientras que, la exposición al frío provoca un aumento del consumo de oxígeno. De forma que, durante la exposición al frío y a la hipoxia de forma simultánea, el organismo se enfrenta a un aumento en la demanda de oxígeno en una situación de baja disponibilidad (Banchemo *et al.*, 1985; Gautier *et al.*, 1991).

Estudios previos han observado que la hipoxia produce alteraciones en la termorregulación de los homeotermos. Durante la exposición a la hipoxia se ha visto que el consumo de O₂ se ve reducido, debido a entre otras cosas, a la inhibición transitoria de la ST y a un descenso de la NST, que, por consiguiente, produce una reducción en la temperatura corporal de los animales. Esta alteración en la capacidad de termorregulación adquiere mayor importancia cuando los organismos son expuestos a ambientes fríos. Uno de los posibles motivos de esta alterada termorregulación son los cambios en la termosensibilidad de las neuronas preópticas (Gautier *et al.*, 1991).

En los años 80, el grupo liderado por Natalio Banchemo fue pionero en el estudio de los efectos del frío y de la hipoxia en los animales. Sus trabajos abrieron paso a considerar que la exposición al frío y a la hipoxia de manera concurrente y por separado pueden producir respuestas diferentes en la cascada de transporte de oxígeno y a nivel muscular, y que estas respuestas no afectan de igual forma a todos los sistemas (Banchemo *et al.*, 1985).

Trabajos posteriores han demostrado la existencia de una adaptación cruzada entre estos dos factores, demostrando que repetitivas inmersiones en agua fría pueden ayudar a la aclimatación del sistema nervioso autónomo y cardio-respiratorio de cara a una posterior realización de ejercicio en hipoxia (Lunt *et al.*, 2010). Recientemente,

nuestro grupo ha descrito que la exposición intermitente al frío y a la hipoxia neutraliza los efectos pro-inflamatorios y la pérdida de peso observados en los animales expuestos a hipoxia intermitente de forma aislada (Ramos-Romero *et al.*, 2020).

Los diferentes estudios realizados muestran que el proceso de aclimatación a la altitud es un proceso muy complejo, que va más allá de la coexistencia de dos factores altamente estresantes para el organismo. Los resultados evidencian la necesidad de estudiar estos dos factores tanto de forma simultánea como por separado para poder comprender la adaptación de cada sistema a la altura.

5. Contexto

Trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio constataron el potencial efecto de la hipoxia hipobárica intermitente y el ejercicio aeróbico ligero en la recuperación del daño muscular post-ejercicio excéntrico (Núñez-Espinosa *et al.*, 2015; Rizo-Roca *et al.*, 2017a, 2017b). Basándonos en estas primeras evidencias decidimos dar un paso adelante y observar el posible papel de la hipoxia hipobárica en la recuperación de lesiones de una mayor magnitud. Tras haber observado previamente que el estímulo hipóxico produce una mayor respuesta fisiológica cuando es aplicado junto con el ejercicio, consideramos que la utilización de un estímulo adicional a la hipoxia podría ser interesante de cara a buscar la mayor y mejor respuesta fisiológica posible. Es por ello, que finalmente en el presente trabajo se han decidido utilizar la HHI y el frío intermitente, tanto de forma conjunta como por separado, para conocer las respuestas fisiológicas de nuestro organismo ante estos estímulos y su posible aplicación como herramienta terapéutica en el tratamiento de las lesiones musculares.

Objetivos

El objetivo general de la presente investigación se basa en estudiar si la exposición al frío, a la hipoxia o a ambos estímulos simultáneamente, en un modelo de exposición intermitente, favorece los procesos de regeneración tras la inducción de una lesión muscular.

Objetivos específicos:

- Confirmar la existencia de una simetría bilateral tanto a nivel histológico como funcional en el músculo gastrocnemio.
- Validar el método de lesión muscular inducido quirúrgicamente y los procedimientos de evaluación de la regeneración muscular tanto a nivel histológico como funcional.
- Conocer las diferentes respuestas de composición corporal, hematológicas y morfofuncionales del músculo (morfometría, capilarización y tipos de fibras) de las ratas sometidas a exposiciones intermitentes al frío, a la hipoxia, y al frío y a la hipoxia simultáneamente.
- Establecer si el proceso de regeneración muscular tras una lesión traumática difiere o no entre los animales del grupo control y de los grupos experimentales, tratados con tres protocolos de exposición intermitente: frío, hipoxia y frío + hipoxia, durante 9 y 21 días:
 - I. Determinar las posibles diferencias en la recuperación de la función muscular post-lesión entre los diferentes grupos, a través de la evaluación de la fuerza pico, fuerza tetánica y resistencia a la fatiga.
 - II. Analizar las diferencias en el proceso de regeneración muscular de los diferentes grupos a través de marcadores específicos de regeneración muscular y fibrosis.
 - III. Evaluar el papel de diferentes proteínas musculares involucradas en la regulación de la masa, homeostasis y regeneración muscular tras el uso de los tres tratamientos experimentales diferentes.

Materiales

y

Métodos

1. Animales

A lo largo del experimento se utilizaron un total de 121 ratas: machos adultos de la cepa Sprague-Dawley (Envigo, Italia) con un peso inicial de 211 ± 28 g (media \pm SD). Los animales se mantuvieron a una temperatura media de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, con acceso a agua y comida *ad libitum* a lo largo de todo el periodo de intervención y con ciclos de luz-oscuridad de 12 h. Se registró diariamente el peso de los animales con el fin de controlar su bienestar y los efectos de los diferentes tratamientos. Todos los procedimientos llevados a cabo a lo largo del estudio fueron previamente aprobados por la *Direcció General del Medi Natural i Biodiversitat de la Generalitat de Catalunya* (#8784/03-09-2015).

2. Inducción quirúrgica de la lesión muscular

Tras una semana de cuarentena, los animales fueron quirúrgicamente lesionados siguiendo el método previamente publicado por Contreras-Muñoz *et al.* (2016). En este trabajo se demuestra mediante técnicas histológicas, funcionales y de imagen la adecuación del uso de este método quirúrgico para imitar lesiones musculares deportivas tipo II.

Para llevar a cabo la lesión muscular los animales fueron situados en una cámara hermética y anestesiados mediante la inhalación de isoflurano (Zoetis, España). Una vez dormidos, los animales fueron colocados en posición prona sobre una tabla de trabajo con el hocico emplazado dentro de una máscara de inhalación, para garantizar la inhalación del anestésico durante todo el procedimiento. Una vez en decúbito prono, se fijaron con cinta adhesiva las patas traseras y la cola a la tabla de trabajo, exponiendo la parte ventral de la pata derecha. Tras ello, la pata fue rasurada y desinfectada con etanol y se identificó el lugar exacto de la lesión. La lesión quirúrgica se realizó en el músculo gastrocnemio derecho a una distancia de 7 mm del final del tendón calcáneo y a una profundidad aproximada de 2 mm. Para inducir la lesión se utilizó una aguja biopsiadora de 18 G y de un diámetro interno de 0.84 mm (Bard® Monopty® Disposable Core Biopsy Instrument, Bard Biopsy Systems, Estados Unidos). Finalmente, y una vez realizada la

lesión, se aplicó antiséptico en las heridas generadas y se administró analgesia de forma subcutánea (Buprenorfina 0.01 mg/kg).

3. Grupos experimentales

Tras ser lesionados, los animales fueron aleatoriamente asignados a los diferentes grupos experimentales. Se crearon un total de cuatro grupos de intervención y dos puntos temporales de muestreo para cada grupo. Los protocolos de intervención comenzaron al día siguiente de ser inducida la lesión muscular y tuvieron una duración de 9 o 21 días, periodo tras el cual los animales fueron sacrificados.

- 1) Grupo control [CTRL]. Los animales se recuperaron de la lesión de forma pasiva, sin ser sometidos a ningún tratamiento. Dentro de este grupo los animales se subdividieron en dos grupos, en función de los días transcurridos desde la lesión hasta su punto final: [CTRL_9] (n=14) y [CTRL_21] (n=14).
- 2) Grupo frío [COLD]. Tras ser lesionados, los animales de este grupo fueron sometidos a un protocolo de frío intermitente, es decir, fueron expuestos cada día durante 4 h a una temperatura ambiental de 4°C. Este grupo se subdividió en dos grupos, considerando los días de tratamiento que recibieron tras la lesión. Así, un grupo fue sometido durante 9 días al protocolo de frío intermitente [COLD_9] (n=16) y el otro durante 21 días [COLD_21] (n=14).
- 3) Grupo hipoxia [HYPO]. Los animales fueron sometidos a sesiones diarias de 4 h de hipoxia hipobárica simulada. En función de la duración del tratamiento y del punto final de los animales se crearon dos subgrupos: [HYPO_9] (n=10), los animales fueron expuestos a hipoxia hipobárica durante 9 días, mientras que el grupo [HYPO_21] (n=10) lo hizo durante 21 días.
- 4) Grupo frío + hipoxia [COHY]. Los animales de este grupo fueron tratados con hipoxia hipobárica y frío intermitente de forma simultánea 4 h/día durante un periodo de 9 [COHY_9] (n=16) o 21 días [COHY_21] (n=14).

Previo al inicio del estudio que nos ocupa, se realizaron dos experimentos para validar el modelo animal que se utilizaría en el presente estudio. Para ello, se crearon dos grupos de animales adicionales para llevar a cabo cada uno de los dos experimentos de validación:

- 5) Grupo [CTRL_LAT] (n=6). Este grupo de animales fue utilizado para validar las posibles diferencias funcionales e histológicas existentes entre el gastrocnemio derecho e izquierdo de las ratas. Los animales de este grupo no sufrieron ningún tipo de lesión ni de intervención, únicamente fueron sometidos a una prueba de función muscular y posteriormente sacrificados.

- 6) Grupo [CTRL_0] (n=6). Los animales de este grupo fueron lesionados y sacrificados 24 h después de sufrir la lesión. Los animales no fueron manipulados entre la lesión y el sacrificio. Este grupo fue creado para validar el protocolo de lesión (medir el grado de lesión generado) y su impacto en la función muscular.

4. Protocolos de intervención

4.1. Exposición a hipoxia hipobárica intermitente [HHI]

Para la exposición a hipoxia hipobárica los animales fueron introducidos, junto con su propia jaula de estabulación, dentro de una cámara hipobárica. La cámara hipobárica, con una capacidad de 136 L (60x60x60) (Plásticos Pavón S.L., España), admite el emplazamiento de dos jaulas de animales en su interior. Las paredes de la cámara hipobárica, hechas de plástico metacrilato (35 mm grosor), permitían observar en todo momento el comportamiento y estado de los animales.

El vacío relativo del interior de la cámara hipobárica era generado a través de una bomba rotacional de vacío (TRIVAC D5E, Leybold-Oerlykon, Alemania). Mediante una válvula micrométrica se controlaba el flujo de entrada y salida de aire del interior de la cámara, y se garantizaba un flujo de aire continuo para evitar la acumulación de CO₂ en el interior de la cámara. La presión interna era controlada mediante dos sensores diferenciales (ID 2000, Leybold-Oerlykon, Alemania) conectados a un controlador de succión (Combivac IT23,

Leybold-Oerlykon, Alemania) y a un regulador de presión de diafragma (MR16, Leybold-Oerlykon, Alemania). La presión objetivo era de 577 hPa, equivalentes a 4.500 m de altitud. Para obtener dicha presión, la presión interna de la cámara se reducía de forma paulatina durante un periodo de 15 min. Una vez conseguida la presión deseada, los animales eran mantenidos a esta presión durante 4 h. Al finalizar este tiempo, se realizaba una despresurización de la cámara gradual durante 15 min hasta volver a alcanzar el nivel de presión atmosférica inicial.

4.2. Exposición a frío intermitente [ICE, *Intermittent Cold Exposure*]

Para llevar a cabo la exposición intermitente al frío los animales, junto con sus jaulas de estabulación, fueron colocados en una cámara refrigerada a una temperatura ambiental de 4°C durante 4 h al día.

4.3. Exposición simultánea al frío y a la hipoxia intermitente (frío + hipoxia)

Los animales de este grupo fueron sometidos de forma simultánea al frío y a la hipoxia intermitente. Para ello, la cámara hipobárica fue instalada en el interior de la cámara refrigerada, sometiendo a los animales a una temperatura de 4°C y una presión barométrica de 577 hPa de forma simultánea durante 4h al día.

5. Disección y obtención de tejidos y sangre

En el punto final de los animales se extrajo sangre de la vena cava abdominal. La sangre obtenida fue analizada mediante el analizador hematológico (Coulter Spincell 3, Spinreact, España) y se obtuvieron los siguientes parámetros hematológicos: Hematocrito (Htc), contaje de glóbulos rojos (RBC, *Red Blood Cells*), concentración de hemoglobina ([Hb]), volumen corpuscular medio (MCV, *Mean Corpuscular Volume*), hemoglobina corpuscular media (MCH, *Mean Corpuscular Hemoglobin*), concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC, *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*), contaje de globulos blancos (WBC, *White Blood Cells*) y de plaquetas.

Además, junto con la extracción de sangre se realizó la disección de diferentes tejidos con el fin de obtener información acerca de la composición corporal de los animales y del efecto de los diferentes protocolos de intervención. Para cada grupo se extrajeron los siguientes tejidos:

Grupos	Tejidos
CTRL_LAT	<ul style="list-style-type: none"> • Gastrocnemio (GAS) • Cuádriceps • Tibial anterior (TA) • Sóleo (SOL) • Extensor largo de los dedos (EDL, <i>Extensor Digitorum Longus</i>)
CTRL_0	<ul style="list-style-type: none"> • Gastrocnemio (GAS)
CTRL_9, CTRL_21	<ul style="list-style-type: none"> • Gastrocnemio (GAS) • Tibial anterior (TA)
COLD_9, COLD_21	<ul style="list-style-type: none"> • Tejido adiposo marrón (BAT, <i>Brown Adipose Tissue</i>) • Tejido adiposo perigonadal (PAT, <i>Perigonadal Adipose Tissue</i>)
HYPO_9, HYPO_21	<ul style="list-style-type: none"> • Diafragma
COHY_9, COHY_21	<ul style="list-style-type: none"> • Corazón

6. Pruebas funcionales de fuerza

Las ratas de los diferentes grupos fueron sometidas a pruebas funcionales *in vivo* para valorar las capacidades contráctiles del músculo gastrocnemio. Todos los procedimientos se llevaron a cabo a una temperatura constante de la sala de 22-24°C, y se recubrió el músculo gastrocnemio con aceite mineral (*Mineral oil*, Sigma–Aldrich) para evitar la deshidratación del mismo a lo largo del procedimiento. A continuación se lista de manera sintética el protocolo:

Preparación del animal
1. Anestesiarse la rata y colocar la rata en posición prona sobre la tabla de disección.
2. Cortar el tendón calcáneo por su inserción distal (unión tendón-hueso calcáneo).
3. Separar y aislar por completo el músculo gastrocnemio de la masa muscular circundante manteniendo la inserción proximal, el aporte sanguíneo y los nervios intactos.
4. Unir el tendón calcáneo mediante un hilo al transductor de fuerza (MLT 1030/D, ADInstruments) conectado al hardware de adquisición de medidas (PowerLab/16SP, ADInstruments).
5. Realizar una incisión lateral en el muslo del animal exponiendo el nervio ciático.
6. Colocar el electrodo en el nervio ciático y unirlo al estimulador eléctrico (Stimulus Isolator FE180, ADInstruments).
7. Inmovilizar la rodilla y el tobillo del animal para evitar movimientos durante la estimulación y el registro, dejando la pata completamente estirada.
8. Cubrir el gastrocnemio con aceite mineral, para evitar su deshidratación y secado durante todo el procedimiento.

Una vez aislado el músculo, se estableció una tensión pasiva inicial de 300 mN. Tras ello, y antes de empezar a evaluar los diferentes parámetros funcionales, se fijó la longitud óptima de contracción (L_0), es decir, la posición (nivel de extensión) óptima en el que el músculo es capaz de generar la mayor fuerza. Para ello, se evaluó la fuerza a diferentes longitudes del músculo, con el fin de encontrar el punto de extensión óptimo donde se generará la máxima fuerza antes de que ésta comenzase a decrecer. Una vez identificado el L_0 se realizaron las siguientes pruebas para evaluar las capacidades contráctiles del músculo:

1) Fuerza de contracción (*peak force*)

Definición: fuerza de contracción del músculo en un estímulo aislado.

- Frecuencia de estimulación 1 Hz a una amplitud de 3 mA.
- Se registra el promedio de 5 estímulos/contracciones aisladas.
- A partir de este parámetro se calculan:
 - La máxima fuerza de contracción (*TwF, maximum twitch force*)
 - El tiempo de contracción (*CT, contraction time*)
 - El tiempo de relajación transcurrido hasta obtener la mitad de la contracción máxima (*HRT, half-relaxation time*)

2) Fuerza tetánica máxima (*TetF, maximum tetanic force*)

Definición: fuerza de contracción máxima que un músculo puede ejercer gracias a la sumación de ondas.

- Se produce mediante trenes de estímulos generados durante 1 s a una amplitud de 3 mA.
- Se comienza desde los 10 Hz, y progresivamente en cada tren de estímulos se van incrementando las frecuencias de estimulación en 10 Hz hasta una frecuencia de 200 Hz.
- Se realiza una pausa de 1 min entre cada tren para evitar la fatiga muscular.
- Este procedimiento permite la obtención de la fuerza tetánica máxima y la realización de una curva fuerza-frecuencia a partir de los registros obtenidos.

Entre la prueba de fuerza tetánica y la fatiga a baja frecuencia se realizó una pausa de recuperación de 3 min, con el fin de permitir la recuperación del músculo de la posible fatiga producida por las propias pruebas de evaluación.

3) Fatiga a baja frecuencia (*LFF, Low frequency fatigue*)

Definición: estimulación del músculo a baja frecuencia durante un largo periodo con el fin de provocar una fatiga muscular.

- Se produce mediante una estimulación continua del músculo durante 2 min a una frecuencia de estimulación de 30 Hz y una amplitud de 3mA.

Las pruebas de evaluación de las capacidades funcionales se llevaron a cabo en ambos músculos gastrocnemios de cada animal, aleatorizando la pata que era sometida en primer lugar a las pruebas. Los valores obtenidos fueron normalizados siempre por el peso del músculo gastrocnemio correspondiente. Todos los registros fueron tomados y analizados mediante el software LabChart 7 (AD Instruments).

7. Histoquímica

Para llevar a cabo las diferentes tinciones histoquímicas se realizaron cortes transversales seriados del músculo gastrocnemio, de un grosor de entre 14-16 μm , en un criostato a -22°C (Leica 3050S, Alemania). Los cortes se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados al 0.2%, con el fin de mejorar la adherencia de la muestra. Antes de realizar las diferentes tinciones histoquímicas los cortes fueron fijados con un tampón de formalina-sacarosa durante 5 min, con el fin de evitar la retracción y arrugamiento de las muestras (Viscor *et al.*, 1992). Tras ello, se realizaron las siguientes tinciones: 1) Succinato deshidrogenasa (SDH) (Nachlas *et al.*, 1957); 2) Miosina adenosina-trifosfatasa (mATPasa) (Brooke & Kaiser, 1970); 3) Adenosina-trifosfatasa endotelial (eATPasa) (Fouces *et al.*, 1993).

7.1. Tinciones histoquímicas

7.1.1. Método succinato deshidrogenasa (SDH)

Este método permite detectar la actividad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa (SDH) y está basado en el método de Natchlas *et al.* (1957). Esta tinción es utilizada para diferenciar las fibras oxidativas y no oxidativas.

Protocolo
1. Fijación en formalina-sacarosa durante 5 min a 4°C.
2. 15 lavados con H ₂ O destilada.
3. 1 h de incubación en baño termostático en agitación (37-40°C).
4. Aclarado en H ₂ O destilada.
5. Montado con glicerina.

- Medios de incubación:

Medio de incubación (50 mL)
<ul style="list-style-type: none"> • 12.5 mL tampón fosfato + 12.5 mL solución succinato sódico (0.2 M) • 25 mL solución <i>Nitroblue tetrazolium</i> (1 mg/mL)

- Soluciones de *stock* (almacenadas a 4°C):

Medio de fijación formalina-sacarosa
<ul style="list-style-type: none"> • Cacodilato sódico 0.144 M • Sacarosa 0.336 M • CaCl₂ 0.068 M • Solución en formalina al 5%

Tampón fosfato

- 250 mL fosfato diácido monopotásico (KH_2PO_4) (0.2 M)
- 212.5 mL NaOH (0.2 N)

7.1.2. Método miosina adenosina-trifosfatasa (mATPasa)

Mediante este método podemos detectar la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa miofibrilar, y está basado en el método de Brooke & Kaiser (1970). Gracias a esta tinción se pueden diferenciar las fibras en relación con su capacidad contráctil, y por lo tanto clasificarlas en fibras tipo I y fibras tipo II.

Protocolo

1. Fijación en formalina-sacarosa durante 5 min a 4°C.
2. 15 lavados con H_2O destilada.
3. Pre-incubación en medio alcalino durante 10 min a temperatura ambiente.
4. 15 lavados con H_2O destilada.
5. 30 min de incubación en baño termostático en agitación (37-40°C).
6. 15 lavados con H_2O destilada.
7. Incubación en CaCl_2 al 1% durante 3 min a temperatura ambiente.
8. 5 lavados con H_2O destilada.
9. Incubación en CoCl_2 al 2% durante 3 min a temperatura ambiente.
10. 5 lavados con H_2O destilada.
11. Sumergir durante 1 min en sulfuro de amonio al 1%.
12. Aclarado con agua de grifo.
13. Montado en glicerina.

- Medios de incubación:

Medio de pre-incubación alcalina (120 mL)

- 40 mL 50 mM glicina
 - 40 mL 30 mM CaCl₂
 - 40 mL 50 mM NaCl
-
- Ajustar pH a 10.7

Medio de incubación (100 mL)

- 50 mL 30 mM CaCl₂
 - 50 mL tampón glicina NaOH
 - 3 mM ATP (sal disódica)
-
- Ajustar pH a 9.4

- Soluciones de *stock* (almacenadas a 4°C):

Medio de fijación formalina-sacarosa

- Cacodilato sódico 0.144 M
- Sacarosa 0.336 M
- CaCl₂ 0.068 M
- Solución en formalina al 5%

Tampón glicina NaOH (1 L)

- 300 mL solución A (tampón glicina) + 700 mL solución B (NaOH)
 - Solución A:
 - Glicina 50 mM
 - NaCl 50 mM
 - Solución B:
 - NaOH 0.1 N

7.1.3. Método adenosina-trifosfatasa endotelial (eATPasa)

Mediante este método se pueden teñir los capilares musculares en cortes transversales. El método se basa en la detección de la actividad ATPasa de las células del endotelio capilar (Fouces *et al.*, 1993).

Protocolo
1. Fijación en formalina-sacarosa durante 5 min a 25°C.
2. 15 lavados con H ₂ O destilada.
3. 1 h de incubación en baño termostático en agitación (37-40°C).
4. 15 lavados con H ₂ O destilada.
5. Sumergir durante 1 min en sulfuro de amonio al 1%.
6. Aclarado con agua de grifo.
7. Montado en glicerina.

- Medios de incubación:

Medio de incubación
<ul style="list-style-type: none">• 1.2 g de gelatina + 1.9 g tris-maleato en 80 mL H₂O destilada.• 12 mL nitrato de plomo (0.06 M)• 20 mL CaCl₂ (0.068 M)• 80 mL H₂O destilada• 3 mM ATP
<ul style="list-style-type: none">• Ajustar pH a 7.2

7.2. Medidas morfofuncionales de las fibras

Se seleccionaron tres campos diferentes del músculo gastrocnemio: rojo, intermedio y blanco (**Figura 10**), de acuerdo con lo previamente descrito por Armstrong & Phelps (1982). La obtención de las imágenes de las diferentes zonas del músculo seleccionadas se realizó a través de un microscopio óptico (BX61, Olympus, Japón) conectado a una cámara digital (DP70, Olympus, Japón) a un aumento de 20x. Las imágenes obtenidas ($5.5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$) fueron analizadas utilizando el programa ImageJ (v. 1.51n; Instituto Nacional de Salud, Estados Unidos).

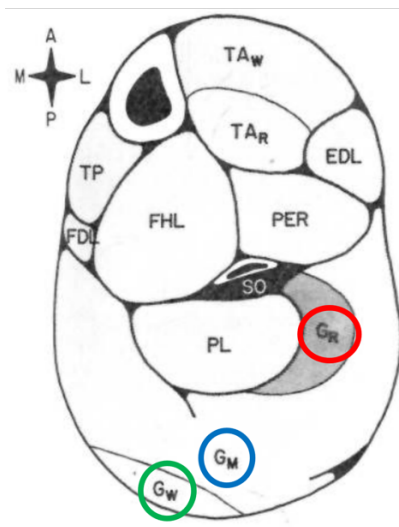


Figura 10: Corte transversal de una pata de rata. Los círculos indican los diferentes campos que componen el músculo gastrocnemio (G) en función de la población de fibras. Círculo rojo (zona roja), círculo azul (zona intermedia), círculo verde (zona blanca). Figura adaptada de Armstrong & Phelps (1984).

A partir de la tinción eATPasa se realizaron las siguientes mediciones: área de la sección transversal de la fibra (FCSA), diámetro de Feret, número de capilares en contacto con cada fibra (NCF), índice de capilarización por cada $1000 \mu\text{m}^2$ expresado como la relación entre el NCF y FCSA ($\text{CCA} = \text{NCF} \cdot 10^3 / \text{FCSA}$), densidad capilar (CD), densidad de fibras (FD) y cociente de capilares por fibra ($\text{C/F} = \text{CD} / \text{FD}$).

Tabla 2: Clasificación de los diferentes tipos de fibras en base a la tinción mATPasa y SDH.

Tipo de fibra	SO	FOG	FIG	FG
Tinción mATPasa (pH 10.7)	No se detecta tinción	Marrón	Marrón	Marrón
Tinción SDH	Azul moderado-intenso	Azul intenso	Azul moderado	Azul claro

mATasa, miosina adenosina-trifosfatasa; SDH, succinato deshidrogenasa; SO, fibras lentas oxidativas; FOG, fibras rápidas oxidativas glucolíticas; FIG, fibras rápidas intermedias glucolíticas; FG, fibras rápidas glucolíticas.

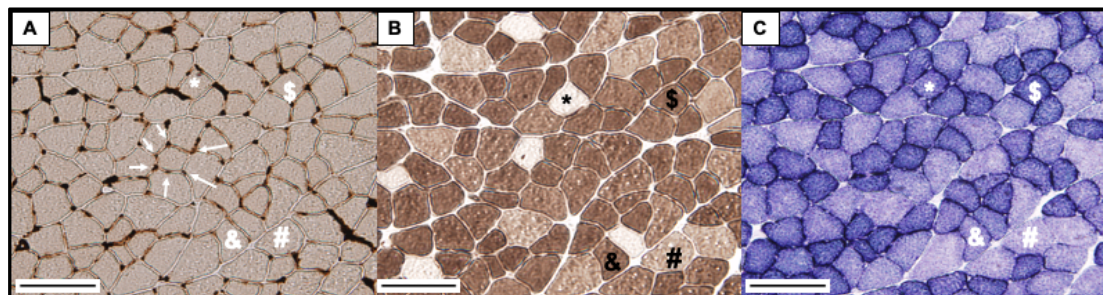


Figura 11: Muestra microfotográfica de las diferentes tinciones histológicas. (A) Tinción endotelial ATPasa, (B) tinción miosina adenosina-trifosfatasa, (C) tinción succinato deshidrogenasa. Los símbolos indican: * SO, fibras lentas oxidativas; \$ FOG, fibras rápidas oxidativas glucolíticas; & FIG, fibras rápidas intermedias glucolíticas; # FG, fibras rápidas glucolíticas. Los capilares musculares son indicados mediante flechas. La escala indica 100 μ m.

Las tinciones SDH y mATPasa fueron utilizadas para identificar los diferentes tipos de fibras musculares de acuerdo con su carácter oxidativo y su velocidad contráctil, a partir de una adaptación de la nomenclatura propuesta por Peter *et al.* (1972). De modo que las fibras fueron clasificadas como: 1) fibras lentas oxidativas (SO), 2) fibras rápidas oxidativas-glucolíticas (FOG), 3) fibras rápidas intermedias-glucolíticas (FIG), 4) fibras rápidas anaeróbicas-glucolíticas (FG). La **Tabla 2** resume estas características y la **Figura 11** muestra una microfotografía ejemplo de los diferentes tipos de fibras y capilares fibrilares.

8. Western blot

8.1. Extracción de proteína mediante lisado muscular

Para la preparación de los lisados musculares se homogenizaron los músculos gastrocnemios completos, para asegurarnos de incluir toda la extensión de la lesión en el homogenado y la inclusión de todas las zonas diferentes que conforman el gastrocnemio.

Protocolo parte A: preparación del músculo

1. En hielo seco cortar el músculo gastrocnemio (a excepción del tendón calcáneo y los extremos) en trozos de ~10 mg mediante el uso de un bisturí.
2. Preparar tubos para homogenados de 2 mL (Bertin, Technologies, Francia) con bolas de circonio de diferentes tamaños en su interior: 4 bolas de 1.4 mm y tres bolas de 2.8 mm (Bertin, Technologies, Francia).
3. Colocar dentro de cada tubo para homogenado ~100 mg de músculo previamente cortado.
4. Añadir a cada tubo la cantidad adecuada de *buffer* de lisado.

Protocolo parte B: disgregación mecánica

1. Disgregar mecánicamente las muestras con la ayuda del aparato *Precellys® Evolution tissue homogenizer* (Bertin Technologies, Francia).
2. Usar del siguiente programa para llevar a cabo la disgregación mecánica.
Programa: PROT MUSCLE
Características del programa:
 - Tube: 2mL
 - Speed: 6.500 RPM
 - Cycle: 8 x 25 s
 - Pause: 15 s

Protocolo parte C: Sonicado de muestras

1. Para sonicar las muestras realizar 3 ciclos, de 10 pulsos cada uno de ellos, dejando la muestra reposar unos minutos entre ciclos.

Protocolo parte D: centrifugado y separación de sobrenadante

1. Centrifugar las muestras 12 min a 16°C a una velocidad de 25.000 g.
2. Separar el *pellet* y el sobrenadante.
3. Guardar el sobrenadante o lisado muscular obtenido en el congelador a -80°C hasta su posterior uso.

- Medios utilizados para la preparación de los lisados:

Inhibidor de fosfatasas (PhosphoSTOP 10X)

- 1 pastilla de PhosStop (Sigma Aldrich)
- 1 mL de H₂O miliQ

Inhibidor de proteasas (Complete 50X)

- 1 pastilla de complete Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Aldrich)
- 1 mL de H₂O miliQ

Buffer Urea 6M-1% SDS (100 mL)

- 36.6 g Urea
- 5 ml SDS 20%
- Enrasar con H₂O miliQ

Buffer lisado

Para 10 mg de músculo:

- 100 µL Urea 6 M-1% SDS
- 2 µL Complete 50X
- 10 µL PhosphoSTOP 10x

8.2. Cuantificación de la proteína total

La proteína total de los lisados musculares fue cuantificada mediante el kit de ensayo *PierceTM BCA Protein Assay Kit* (#23227, ThermoFisher Scientific). Se siguieron todas las indicaciones del protocolo de la casa comercial y la lectura de la placa se realizó en el lector de placas Tecan INFINITE 200 (Tecan Austria GmbH).

8.3. Western blotting

La cantidad requerida de muestra homogenizada se diluyó en el momento de ser usada en un medio o *buffer* de carga. Con el fin de desnaturalizar las muestras y hacerlas visibles durante el proceso de electroforesis.

Buffer de carga electroforesis

- 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8
- 2.3% SDS
- 10% glicerol
- 15% mercaptoetanol
- 0.001% bromophenol azul

Tras ello las muestras se separarán en geles SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*) al 7% o 10% de acrilamida mediante electroforesis.

Protocolo geles acrilamida y electroforesis

1. Limpiar los cristales (1.5 mm de grosor) con etanol y H₂O miliQ.
2. Montar los cristales en los soportes y alinearlos en su parte inferior. Poner vaselina en las esquinas inferiores con el fin de sellar los cristales y la posible salida de líquido.
3. Añadir *separating buffer* con una pipeta *pasteur* en el interior de los cristales hasta llegar a la altura deseada (3/4 del cristal).
4. Nada más añadir el *separating buffer*, añadir agua de forma controlada por las esquinas de los cristales alineando horizontalmente el frente del gel.
5. Transcurridos 40 minutos, si el gel ha polimerizado, retirar el H₂O miliQ añadido en el paso 4.
6. Verter *stacking buffer* entre los cristales hasta sobrepasar por la parte superior.

7. Seguidamente introducir el peine (15 pozos) entre los dos cristales, evitando formar ninguna burbuja entre el peine y el líquido.
8. Pasados 20 minutos, si el gel ha polimerizado, proceder a retirar el peine.
9. Limpiar los restos de acrilamida de los pozos con una aguja.
10. Llenar los pozos con gel de electroforesis (3/4 partes del pozo). A continuación, añadir cada muestra preparada a cada pozo y el marcador de peso molecular en los extremos.
11. Colocar los cristales dentro de la cubeta y llenarla con *buffer de electroforesis 1x*.
12. Efectuar electroforesis a 80 V (voltaje constante) durante 20 min, y trascurrido este tiempo, pasar a 170 V durante el tiempo necesario para que las proteínas migren hasta la altura de nuestro interés.

- Preparado de soluciones para los geles:

Solución Stacking

- 1.5 mL H₂O miliQ
- 450 µL acrilamida
- 666 µL *stacking buffer 4X*
- 42 µL APS 10%
- 5 µL TEMED

<i>Solución Separating</i>	7.5%	10%
H ₂ O mili Q	6.15 mL	4.48 mL
Acrilamida	2.1 mL	3.76 mL
Separating buffer 4x	2.85 mL	2.85 mL
APS 10% (<i>Ammonium Persulfate</i>)	168 µL	168 µL
TEMED	5 µL	5 µL

- Soluciones de *stock* (almacenadas a temperatura ambiente):

<i>Stacking Buffer 4x (100 mL)</i>
<ul style="list-style-type: none"> • 6.06 g Trizma base • 2 mL SDS 20%
<ul style="list-style-type: none"> • Ajustar pH 6.8

<i>Separating Buffer 4x (100 mL)</i>
<ul style="list-style-type: none"> • 18.17 g Trizma base • 2 mL SDS 10%
<ul style="list-style-type: none"> • Ajustar pH 8.8

<i>Buffer electroforesis 10x (1L)</i>
<ul style="list-style-type: none"> • 60 g Trizma base • 288 g glicina • 20 g SDS • 1 L H₂O miliQ

<i>Buffer electroforesis 1x (1L)</i>
<ul style="list-style-type: none"> • 100 mL <i>buffer</i> electroforesis 10x (<i>Stock</i>) • 900 mL H₂O miliQ

Una vez efectuada la electroforesis, se prosiguió con la transferencia de las proteínas a las membranas.

Protocolo transferencia	
1. Activar las membranas de PVDF (<i>Polyvinylidene difluoride</i>) sumergiéndolas en metanol durante 1 min.	
2. Preparar el “sándwich” para la transferencia de la siguiente forma:	
	<p>+</p> <p><i>Esponja</i></p> <p>Papel del filtro</p> <p><i>Membrana Gel</i></p> <p>Papel del filtro</p> <p><i>Esponja</i></p> <p>-</p>
3. Colocar los “sándwich” creados en el interior de la cubeta, y llenar la cubeta con <i>buffer de transferencia 1X</i> (previamente enfriado a 4°C).	

4. La transferencia se lleva a cabo en cámara fría (4°C) durante 90 min a un amperaje constante de 400 mA.

- Soluciones *stock* almacenadas a 4°C.

<i>Buffer transferencia 10x (1L)</i>
<ul style="list-style-type: none"> • 19.3 g Trizma base • 90 g glicina • 1 L H₂O miliQ

<i>Buffer transferencia 1x (1L)</i>
<ul style="list-style-type: none"> • 100 mL <i>buffer</i> transferencia 10x (<i>Stock</i>) • 900 mL H₂O miliQ

Una vez realizada la transferencia, la tinción *Ponceau* permite verificar la eficiencia de la transferencia y comprobar que la carga se ha realizado correctamente, no existiendo diferencias en la cantidad de proteína total entre cada muestra. Todas las bandas/muestras obtenidas al final del proceso fueron finalmente normalizadas respecto a la señal registrada en la tinción de *Ponceau*.

Protocolo tinción <i>Ponceau</i>
1. Incubar las membranas en el medio de tinción <i>Ponceau</i> durante 5 min.
2. Aclarar con H ₂ O miliQ.
3. Tomar imágenes de colorimetría de la tinción <i>Ponceau</i> mediante el equipo Odyssey Fc Imaging System (LI-COR Inc. Biotechnology) y el <i>software</i> Image Studio (v. 5.2.5, LI-COR Inc. Biotechnology).
4. Retirar la tinción de las membranas mediante lavados: 1x10 min en NaOH 0.1 N 1x 10 min TBS-T 1x

- Soluciones stock almacenadas a temperatura ambiente:

<p>Tinción <i>Ponceau</i> (100 mL)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1 g Ponceau S • 50 mL ácido acético • 950 mL H₂O miliQ 	<p>NaOH 0.1 N (1L)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 4 g NaOH • 1 L H₂O miliQ
<p>TBS 10x (1L)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 80 g NaCl • 3.8 KCl • 30 g Trizma Base • 1 L H₂O miliQ <p>• Ajustar pH 7.4</p>	<p>TBS-T 1x (1L)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 100 mL TBS 10x (<i>Stock</i>) • 1900 mL H₂O miliQ • 1 mL Tween 20

Tras la realización de la tinción *Ponceau* se continúa con el bloqueo de la membrana y la detección de proteínas de interés.

Protocolo
1. Para evitar uniones inespecíficas, incubar las membranas con <i>buffer</i> de bloqueo (4% BSA (<i>Bovine Serum Albumina</i>)-TBST 1x) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación.
2. Incubar las membranas con anticuerpos primarios diluidos en <i>buffer</i> de bloqueo (4% BSA-TBST 1x) durante 12-15 h a 4°C en agitación. (véase relación de anticuerpos y diluciones).
3. Lavar las membranas con TBST-1x para eliminar los restos de anticuerpo primario: 3 lavados x 10 min en agitación
4. Incubar las membranas con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en <i>buffer</i> de bloqueo (4% BSA-TBST 1x)

durante 1 h a temperatura ambiente en agitación (véase relación de anticuerpos y diluciones).

5. Lavar las membranas con TBST-1x para eliminar los restos de anticuerpo secundario: 3 lavados x 10 min en agitación.

6. Para obtener la señal quimioluminiscente de las proteínas detectadas, incubar las membranas con el *kit* comercial *Clarity™ Western ECL Substrate* (#170-5061, BioRad) bajo las indicaciones de la casa comercial.

7. Tomar imágenes mediante el equipo Odyssey Fc Imaging System (LI-COR Inc. Biotechnology) y el *software* Image Studio (v. 5.2.5, LI-COR Inc. Biotechnology).

- Listado de anticuerpos primarios utilizados y sus diluciones:

Anticuerpos	Especie	Dilución	Casa comercial	Referencia
HIF-1 α	Mouse	1:1000	ThermoFisher Scientific	MA1-516
VEGF	Mouse	1:1000	ThermoFisher Scientific	MA1-16629
GLUT1	Rabbit	1:1000	Cell-Signaling Technology	#12939
Phospho (T172)-AMPK α	Rabbit	1:500	Cell-Signaling Technology	#2535
AMPK α	Rabbit	1:1000	Cell-Signaling Technology	#5831
Phospho (Ser2448)- mTOR	Rabbit	1:250	Cell-Signaling Technology	#2971
mTOR	Rabbit	1:1000	Cell-Signaling Technology	#2983
Phospho (Ser473)- Akt	Rabbit	1:1000	Cell-Signaling Technology	#4060
Akt	Rabbit	1:1000	Cell-Signaling Technology	#9272

- Listado de anticuerpos secundarios utilizados y sus diluciones:

Anticuerpos	Dilución	Casa comercial	Referencia
Goat anti-rabbit IgG	1:5000	ThermoFisher Scientific	#31460
Goat anti- mouse IgG	1:5000	ThermoFisher Scientific	#31430

En los casos en los que tanto la forma total como la forma fosforilada de una proteína ha sido analizada se ha llevado a cabo un *stripping*, con la finalidad de utilizar las mismas membranas para realizar la detección de ambas formas (forma total y fosforilada) y así evitar posibles alteraciones o cambios.

Protocolo
1. Calentar <i>buffer stripping</i> a 50°C.
2. Incubar membranas con <i>buffer stripping</i> durante 30 min en agitación.
3. Lavar las membranas con TBST-1x para eliminar los restos del <i>buffer stripping</i> : 3 lavados x 15 min en agitación.
4. Comprobar que el stripping ha funcionado: <ul style="list-style-type: none">- Bloquear membrana 1 h a temperatura ambiente con <i>buffer</i> de bloqueo.- Incubar con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en <i>buffer</i> de bloqueo (4% BSA-TBST 1x) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación (véase relación de anticuerpos y diluciones).- Lavar con TBST-1x los restos de anticuerpo secundario: 3 lavados x 10 min en agitación.- Observar la señal quimioluminiscente de las proteínas detectadas mediante los anticuerpos, para ello incubar las membranas con el <i>kit</i> comercial <i>Clarity™ Western ECL Substrate</i> (#170-5061, BioRad) bajo las indicaciones de la casa comercial.
5. Si no se detecta señal pasamos al Punto 6. Si todavía queda señal de la proteína previa en la membrana volvemos al Punto 1.
6. Realizar el protocolo de tinción <i>Ponceau</i> .
7. Incubar con la nueva proteína, para ello realizar el protocolo de bloqueo de membrana y detección de proteínas completo.

9. Inmunofluorescencia

Se realizaron cortes transversales seriados empezando en la unión miotendinosa del tendón calcáneo-músculo gastrocnemio hasta una vez rebasada la lesión muscular. Se realizaron cortes de un grosor de 12 μm en el criostato a -22°C (Leica 3050S, Alemania) y los cortes se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados, con el fin de mejorar la adherencia de la muestra y evitar su retracción.

Mediante la tinción de Hematoxilina-Eosina se identificó el punto de mayor extensión de la lesión, siendo en el portaobjetos equivalente a este nivel donde se efectuó posteriormente la tinción de inmunofluorescencia.

Protocolo Hematoxilina-Eosina
1. Sumergir las muestras durante 3 min en Hematoxilina Harris (VWR chemicals).
2. Aclarar con H_2O destilada hasta eliminar el exceso de colorante.
3. Sumergir las muestras en Eosina al 1% durante 2 min.
4. Aclarar con H_2O destilada hasta eliminar el exceso de colorante.
5. Deshidratar las muestras: <ul style="list-style-type: none"> - 1 min etanol 50% - 2 x 1 min etanol 70% - 1 min etanol 90% - 2 x 1 min etanol 100% - Sumergir 5 s en xileno
6. Montar con DPX

- Medios de *stock* (almacenados a temperatura ambiente):

Eosina 1% (100 mL)

- 1 g Eosina
- 100 μ L de ácido acético glacial
- 100 mL H₂O destilada

A continuación, se muestra el protocolo seguido para realizar las tinciones de inmunofluorescencia:

Protocolo inmunofluorescencia

1. Fijar las muestras en acetona (pre-enfriada a -20°C) durante 10 min a temperatura ambiente.
2. Bloquear las muestras con 3% BSA-PBS1x durante 10 min a temperatura ambiente.
3. Incubar las muestras con anticuerpos primarios diluidos en 3% BSA-PBS 1x durante 18 h a 4°C en una caja húmeda (véase relación de anticuerpos y diluciones).
4. Realizar 3 lavados de 10 min con PBS 1x en agitación.
5. Incubar las muestras con los correspondientes anticuerpos secundarios diluidos en 3% BSA-PBS 1x durante 1 h a 4°C en una caja húmeda (véase relación de anticuerpos y diluciones).
6. Realizar 3 lavados de 10 min con PBS 1x en agitación.
7. Montar con Fluoroshield con DAPI (Sigma-Aldrich).
8. Dejar secar las muestras a temperatura ambiente en oscuridad durante 48 h y posteriormente almacenar a -20°C.

- Listado de anticuerpos primarios utilizados y sus diluciones:

Anticuerpos	Especie	Dilución	Casa comercial	Referencia
<i>anti-Collagen I</i>	Rabbit	1:100	Abcam	ab34710
dMHC	Mouse	1:100	Novacastra	NCL-MHCd

- Listado de anticuerpos secundarios utilizados y sus diluciones:

Anticuerpos	Especie	Dilución	Casa comercial	Referencia
Alexa Fluor® 488	Rabbit	1:1000	ThermoFisher Scientific	#A-11008
Alexa Fluor® 568	Mouse	1:1000	ThermoFisher Scientific	#A-11004

La obtención de las imágenes se realizó a través de un microscopio de fluorescencia (DMIRE2, Leica, Alemania) conectado a una cámara digital (DFC360 FX, Leica, Alemania) a un aumento de 10x. Las imágenes obtenidas fueron analizadas utilizando el programa ImageJ (v. 1.51n; Instituto Nacional de Salud, Estados Unidos). Mediante la tinción dMHC se identificó el número total de fibras positivas en dMHC y se midió su FCSA, además la tinción DAPI nos permitió identificar la presencia de núcleos centrales en las fibras musculares. Finalmente, se calculó el porcentaje de colágeno I en las imágenes de microscopía.

9. Análisis estadístico

Los resultados entre grupos han sido comparados utilizando una ANOVA de una vía, seguido de un *test* Holm-Sidak *post hoc*, o *t-Student* cuando así se requería. Las comparaciones estadísticas solo se han llevado a cabo entre los grupos correspondientes al mismo punto temporal de muestreo, nunca entre los puntos temporales 9 y 21 días. En el caso de las comparaciones entre músculos contralaterales, derecho vs. izquierdo (**Bloques 1 y 3**), se utilizó un *t-test* para muestras apareadas (*Paired test*). La significancia estadística se estableció en $p < 0.05$ y los resultados han sido

reportados como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se ha realizado utilizando el paquete estadístico SigmaPlot 11 (Systat Software, Inc., Estados Unidos).

Muchas de las figuras se encuentran representadas mediante *box- and- whisker plots*. De forma que, las cajas muestran el primer y el tercer tercil separados por la mediana y la media se representa por medio de una cruz. Los *whiskers* o bigotes representan los valores máximos y mínimos para cada grupo. En los casos en los que los resultados se representan por medio de histogramas el valor de cada muestra ha sido representado por un punto, con el fin de mostrar la dispersión de las muestras. Las figuras han sido diseñadas por medio del programa Graph Pad Prism 9 (Graph Pad Software, Inc., Estados Unidos).

Resultados

Los resultados obtenidos en el presente estudio han sido agrupados y divididos en tres bloques principales. El primer bloque está dirigido a la validación del diseño experimental, es decir, a comprobar si el modelo animal utilizado es correcto y válido para llevar a cabo nuestro estudio. En los dos bloques siguientes se agrupan los resultados relacionados con las diferentes respuestas fisiológicas observadas ante la exposición al frío, a la hipoxia, y al frío e hipoxia simultáneamente. De forma que, en el segundo bloque se presentan los diferentes cambios y/o respuestas en la composición corporal, perfil hematológico y en la morfología de las fibras musculares de los animales. Y para finalizar, el tercer bloque recoge los resultados relativos a los efectos de la exposición al frío y/o hipoxia en el proceso de regeneración muscular tras una lesión. Este último bloque aborda los efectos de los tratamientos sobre la regeneración muscular desde un punto de vista funcional, histológico y molecular.

Bloque 1

1. Bloque 1: Validación del diseño experimental

1.1. Simetría anatómica

Antes de dar inicio a nuestro estudio, consideramos que era importante poder comprobar empíricamente si la simetría anatómica existente entre el lado derecho e izquierdo de las ratas se traduce también en una simetría morfo-funcional muscular (Group_LAT). Para ello, en primer lugar, se llevaron a cabo unas pruebas de función muscular *in vivo* en ambos gastrocnemios, con el objetivo de comprobar si la capacidad contráctil del gastrocnemio derecho e izquierdo son iguales (**Figura 12**). Tras ello, se diseccionaron 5 músculos (GAS, TA, SOL, EDL y cuádriceps) de cada una de las patas traseras de los animales, con el fin de poder verificar la existencia o no de diferencias entre los pesos de los músculos del lado derecho e izquierdo del cuerpo (**Tabla 3**). Finalmente, mediante tinciones histoquímicas se tipificaron las fibras musculares de ambos músculos gastrocnemios y se midieron las áreas transversales de dichas fibras, para poder observar las posibles diferencias morfológicas existentes a nivel histológico entre el gastrocnemio derecho e izquierdo (**Figura 13 y 14**).

La **Figura 12** muestra la ausencia de diferencias significativas entre el GAS derecho e izquierdo en la capacidad de generar fuerza (PF: 73.8 ± 13 vs. 71.0 ± 10 mN/g, $p=0.664$; TetF: 219.5 ± 12 vs. 212.9 ± 15 mN/g, $p=0.493$) (**Figura 12A**) y en los tiempos de contracción (CT: 43.3 ± 8 vs. 44.9 ± 14 ms, $p=0.643$) y de relajación (HRT: 77.3 ± 14 vs. 81.8 ± 24 ms, $p=0.495$) (**Figura 12B**). Así mismo, ambas patas registraron valores similares en la resistencia a la fatiga a baja frecuencia ($p=0.591$) y en la recuperación de la fuerza post-fatiga ($p=0.575$) (**Figura 12C**). Por último, no se observaron diferencias significativas en las curvas de fuerza-frecuencia generadas a partir de los registros obtenidos en ambos músculos gastrocnemios (**Figura 12D**). Por lo tanto, y basándonos en estos resultados, podemos considerar que no existen diferencias funcionales entre el gastrocnemio derecho e izquierdo de las ratas.

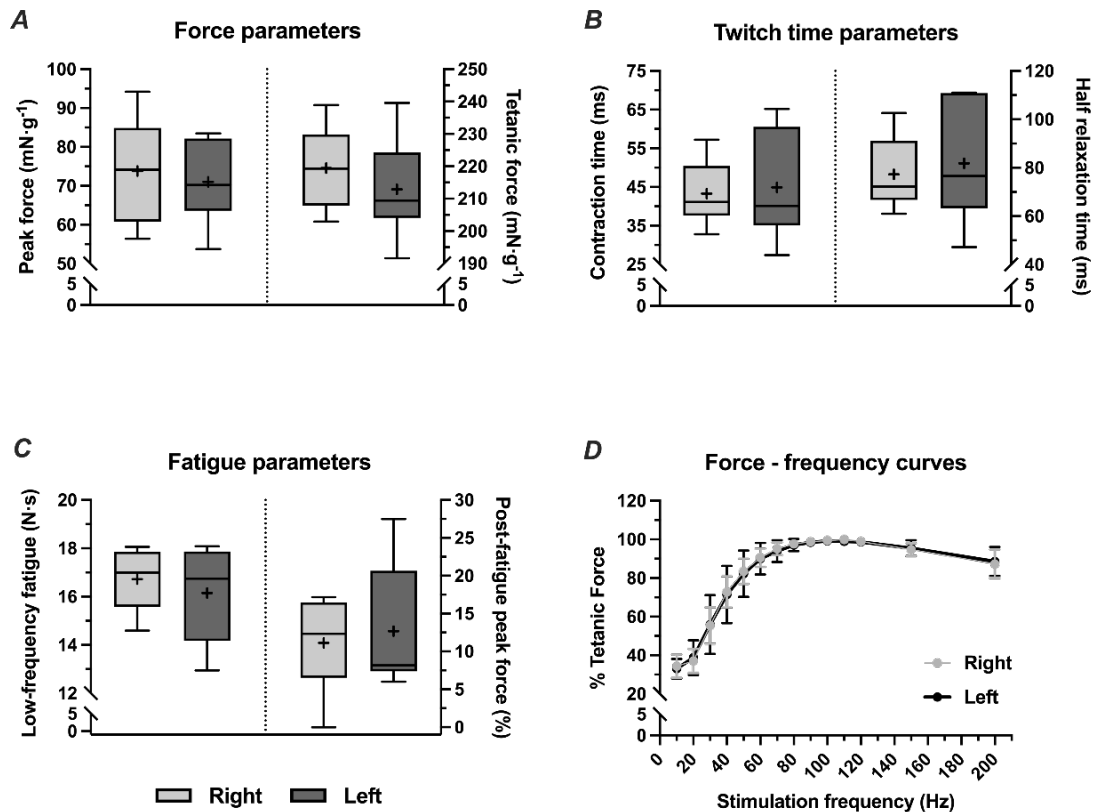


Figura 12: Registros de los diferentes parámetros de funcionalidad muscular evaluados en el gastrocnemio derecho e izquierdo. (A) Parámetros de fuerza: fuerza pico y fuerza tetánica; (B) Parámetros de tiempo: tiempo de contracción y tiempo de relajación; (C) Parámetros de fatiga: fatiga a baja frecuencia y fuerza pico post-fatiga; (D) Curvas de fuerza-frecuencia, expresadas como el porcentaje de fuerza tetánica a diferentes frecuencias de estimulación. Tamaño de la muestra: n=6.

Tabla 3: Pesos de los músculos de las patas traseras derecha e izquierda de las ratas.

	Right	Left	p-value
Gastrocnemius/ Body weight (%)	6.55 ± 0.40	6.49 ± 0.40	0.265
Tibialis anterior/ Body weight (%)	1.96 ± 0.13	2.04 ± 0.18	0.936
Soleus/ Body weight (%)	0.39 ± 0.11	0.42 ± 0.06	0.250
Extensor digitorum longus/ Body weight (%)	0.44 ± 0.03	0.43 ± 0.05	0.318
Quadriceps/ Body weight (%)	6.54 ± 1.46	6.33 ± 1.31	0.326

Los resultados se presentan como la media ± desviación estándar. Los pesos de los músculos han sido normalizados respecto al peso corporal del animal. Tamaño de la muestra: n=6.

En cuanto a los pesos de los músculos diseccionados de las patas traseras de los animales, como se puede observar en la **Tabla 3**, no se detectaron diferencias sistemáticas entre los músculos de las patas derechas e izquierdas, pudiéndose decir que ambas patas presentan una simetría anatómica en cuanto a masa muscular se refiere.

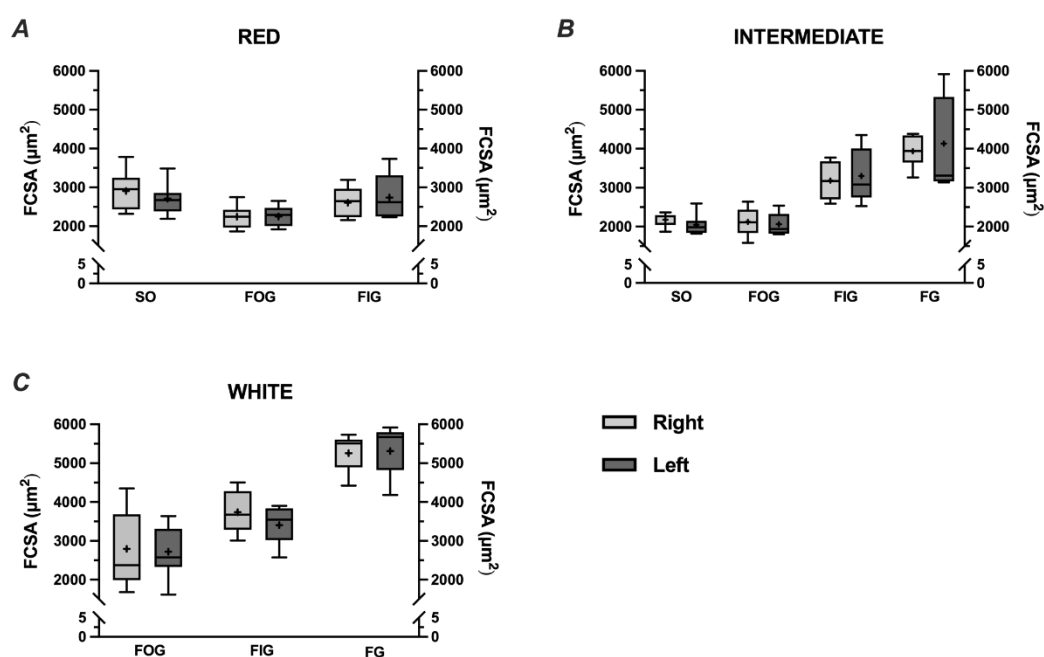


Figura 13: Área transversal de las fibras de los músculos gastrocnemios derecho e izquierdo. Resultados obtenidos en los campos (A) rojo, (B) intermedio y (C) blanco del músculo gastrocnemio. Tamaño de la muestra: n=6. FCSA, área transversal de las fibras; SO, fibras lentas oxidativas; FOG, fibras rápidas oxidativas glucolíticas; FIG, fibras rápidas intermedias glucolíticas; FG, fibras rápidas glucolíticas.

Finalmente, a través de tinciones histoquímicas se analizó el área transversal de las fibras y el porcentaje de cada tipo de fibra en cada uno de los dos músculos gastrocnemios. Como se puede observar en la **Figura 13**, no se han identificado diferencias significativas entre el músculo derecho y el izquierdo en el FCSA de ninguno de los tipos de fibras y en ninguna de las zonas del músculo analizadas (Red: SO: $p=0.394$; FOG: $p=0.970$; FIG: $p=0.701$; Intermediate: SO: $p=0.449$; FOG: $p=0.805$; FIG: $p=0.804$; FG: $p=0.807$; White: FOG: $p=0.902$; FIG: $p=0.404$; FG: $p=0.913$). Además, no se han encontrado diferencias significativas en la población de fibras, observándose proporciones similares de cada tipo de fibra tanto en el gastrocnemio derecho como en el izquierdo en todas las zonas estudiadas (**Figura 14**).

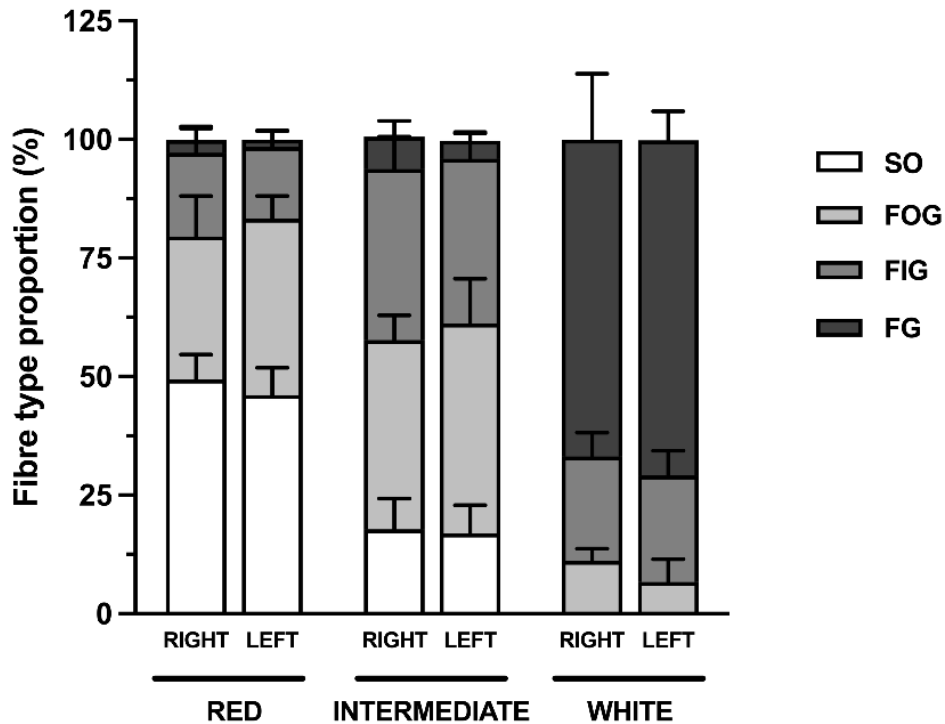


Figura 14: Distribución de los diferentes tipos de fibras en el músculo gastrocnemio derecho e izquierdo. Las fibras han sido analizadas en tres zonas diferentes del músculo gastrocnemio: zona roja, intermedia y blanca. Los resultados se presentan como la media \pm desviación estándar. Tamaño de la muestra: n=6. SO, fibras lentas oxidativas; FOG, fibras rápidas oxidativas glucolíticas; FIG, fibras rápidas intermedias glucolíticas; FG, fibras rápidas glucolíticas.

1.2. Validación del método de lesión

Una vez seleccionado el método de lesión a utilizar, decidimos validar nosotros mismos nuestra capacidad para ejecutar dicho procedimiento, y para ello decidimos incluir en nuestro trabajo un grupo experimental denominado CTRL_0. Los animales del grupo CTRL_0 fueron lesionados quirúrgicamente en su pata derecha, y tras 24 h fueron sometidos a unas pruebas de función muscular (**Figura 15**). Además, los músculos lesionados de este grupo CTRL_0 fueron procesados y teñidos mediante la técnica histológica Hematoxilina-Eosina, con el fin de poder observar a nivel histológico si la lesión se había ejecutado correctamente, y el alcance y lugar de dicha lesión (**Figura 16**).

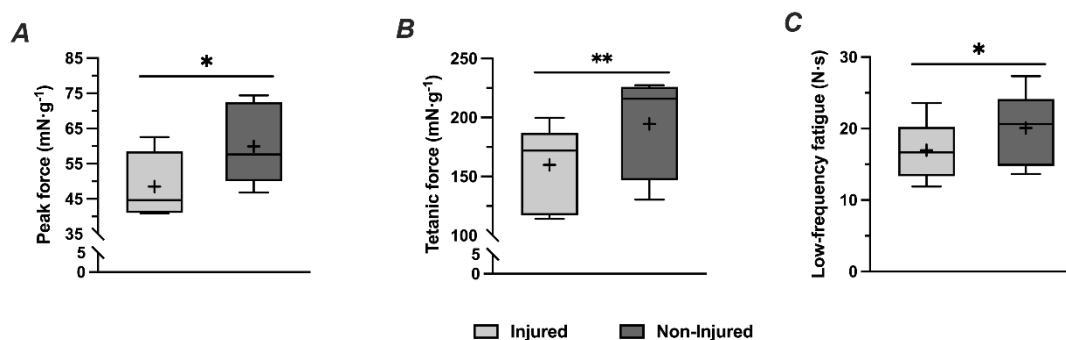


Figura 15: Registros de los parámetros de funcionalidad muscular 24 h post-lesión. Se representan tanto los registros del músculo gastrocnemio lesionado (injured) como del contralateral no lesionado (non-injured). (A) fuerza pico, (B) fuerza tetánica y (C) fatiga a baja frecuencia. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como * $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$. Tamaño de la muestra: $n = 6$.

Como se puede observar en la **Figura 15A-C**, los animales del grupo CTRL_0 mostraron una disminución significativa de la PF, TetF y LFF 24 h después de sufrir una lesión muscular inducida quirúrgicamente ($p = 0.0012$, $p = 0.0008$ y $p = 0.007$, respectivamente). Sin embargo, no se observaron cambios entre el músculo GAS lesionado y el no lesionado en los parámetros CT (39.2 ± 5.5 vs. 39.0 ± 3.5 ms, $p = 0.922$) y HRT (67.7 ± 12.6 vs. 69.0 ± 6.6 ms, $p = 0.637$) (datos no mostrados en gráfico). Por otro lado, el GAS lesionado mostró una relación gastrocnemio/masa corporal significativamente mayor que su contralateral no lesionado (7.35 ± 0.50 vs. 6.92 ± 0.27 %, $p = 0.007$) (datos no mostrados en gráfico). Con estos resultados, se confirma que la lesión inducida mediante este método quirúrgico produce una reducción de la capacidad contráctil del músculo, ya que los parámetros más relevantes en la evaluación de la fuerza muscular aparecen alterados.

A pesar de que las tinciones histológicas no se analizaron cuantitativamente, fueron de gran utilidad para poder verificar la magnitud y localización de la lesión. La **Figura 16A y B** (zona marcada y ampliada) muestra la zona del músculo lesionada, la imagen fue tomada 24 h post-lesión, momento en el cual tienen lugar la degeneración y necrosis de las miofibras. En la zona lesionada se puede apreciar una disrupción de la arquitectura normal del músculo y la infiltración de células inflamatorias.

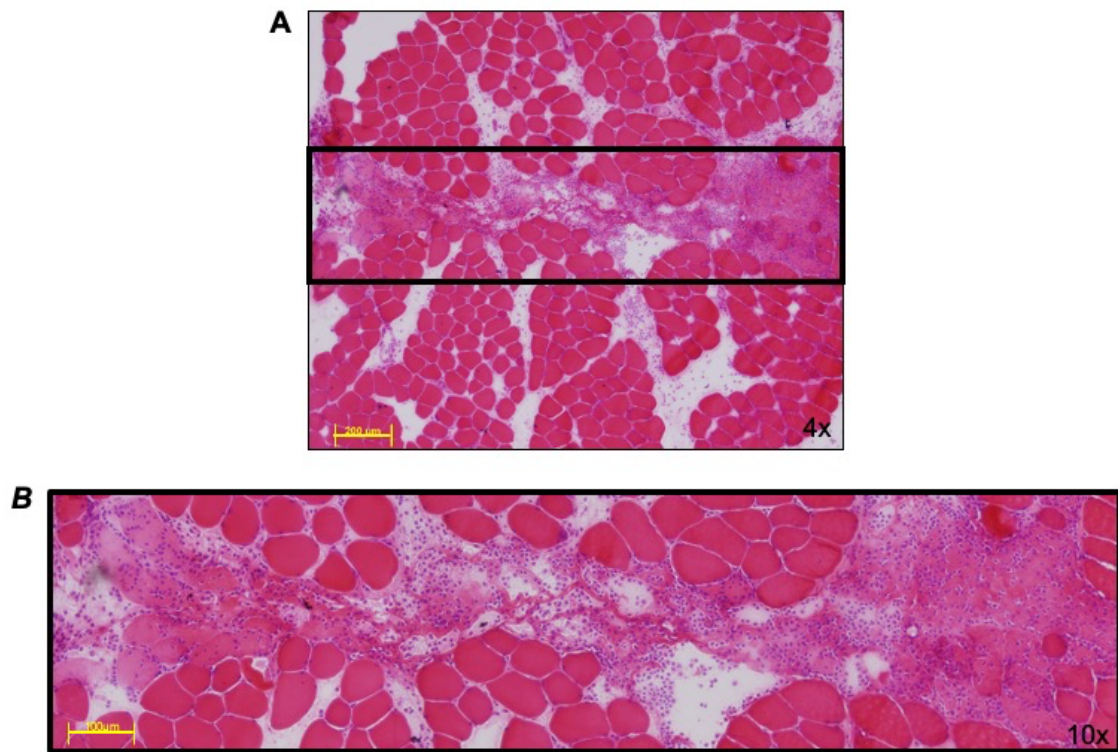


Figura 16: Imagen representativa de la lesión muscular 24 h post-lesión. Tinción histológica de Hematoxilina-Eosina en el músculo gastrocnemio de rata a diferentes aumentos: (A) 4x y (B) 10x.

Bloque 2

2. Bloque 2: Respuestas fisiológicas al frío y la hipoxia

2.1. Evolución del peso de los animales y composición corporal

Con la finalidad de conocer el grado de estrés que los diferentes protocolos podrían generar en nuestros animales, decidimos monitorizar su peso corporal (BW, *Body Weight*) a lo largo del estudio.

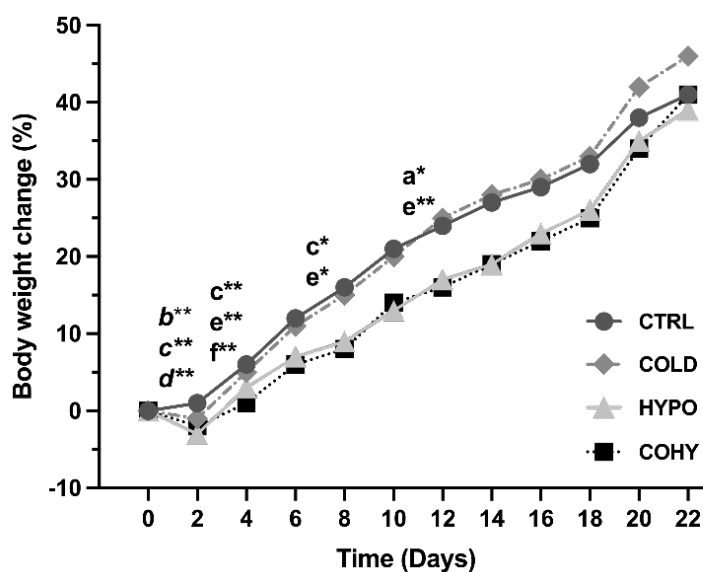


Figura 17: Evolución del peso corporal de los animales. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ entre los siguientes pares: a, CTRL vs. COLD; b, CTRL vs. HYPO, c, CTRL vs. COHY; d, COLD vs. HYPO; e, COLD vs. COHY; f, HYPO vs. COHY. CTRL, control; COLD, frío intermitente; HYPO, hipoxia intermitente; COHY, frío + hipoxia intermitente.

En la **Figura 17** se puede ver la evolución del crecimiento de los animales, con el porcentaje de cambio de peso calculado cada dos días. Los animales de todos los grupos experimentales incrementaron su peso a lo largo del estudio, aunque el crecimiento registrado no fue igual en todos los puntos temporales para todos los grupos de intervención. En el día 2 de intervención los dos grupos sometidos a HHI sufrieron una disminución significativa de su peso corporal en comparación con el grupo CTRL (vs. HYPO, $p < 0.001$; vs. COHY, $p < 0.001$) y el grupo HYPO presentó un incremento del peso corporal menor que el grupo COLD ($p < 0.001$). Entre los días 2 y 4 de estudio los animales sometidos a frío e hipoxia (COHY) exhibieron un crecimiento menor que los animales pertenecientes al resto de grupos ($p < 0.001$), mientras que no se observaron diferencias

entre el resto de los grupos. Es entre los días 6 y 8 cuando se vuelven a detectar diferencias respecto al grupo COHY, observándose en este grupo un incremento del peso corporal menor que en los grupos CTRL y COLD ($p=0.005$ y $p=0.009$, respectivamente). Entre el día 10 y 12 de intervención, el grupo COLD presentó un incremento de peso mayor que los grupos CTRL y COHY ($p=0.006$ y $p=0.001$, respectivamente). En adelante no se registraron más diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos experimentales.

En la **Tabla 4** se muestra el porcentaje de cambio de peso experimentado entre el inicio y el final del estudio por los animales de los diferentes grupos. Pudiéndose apreciar como en el día 9 de intervención los animales expuestos a HHI, tanto de forma aislada como en combinación con el frío, mostraron un incremento del peso corporal menor que los animales control ($p<0.001$ y $p=0.004$, respectivamente). Además, los animales del grupo COHY presentaron un menor incremento de peso en comparación con el grupo COLD ($p<0.026$). Sin embargo, tras 21 días de intervención, el grupo COLD registró una ganancia de peso significativamente mayor que el resto de los grupos, mientras que no se detectaron diferencias significativas entre los demás grupos.

La **Tabla 4** muestra los diferentes parámetros evaluados con el fin de poder conocer como los diferentes tratamientos han podido modificar la composición corporal de los animales. Los animales expuestos a HHI durante 9 días, tanto de forma aislada como junto al frío, presentaron una mayor masa muscular en las patas traseras (peso GAS+TA) que los animales de los grupos COLD y CTRL, aunque estas diferencias únicamente fueron estadísticamente significativas en el grupo HYPO (vs. COLD, $p <0.001$; vs. CTRL, $p=0.006$) (**Tabla 4**). Sin embargo, tras 21 días, todos los grupos intervenidos con algún tipo de tratamiento exhibieron una masa muscular (GAS+TA) mayor que el grupo CTRL ($p<0.001$). Además, el grupo HYPO también mostró una mayor masa muscular en comparación con el grupo COHY ($p=0.001$).

Tabla 4: Parámetros de composición corporal.

	9 days				21 days			
	CTRL n=14	COLD n=15	HYPO n=11	COHY n=16	CTRL n=14	COLD n=13	HYPO n=11	COHY n=14
BW ($\Delta\%$)	24.8 \pm 1.2	22.6 \pm 1.7	18.7 \pm 1.5*	16.5 \pm 1.6**#	41.7 \pm 3.2	48.9 \pm 1.9*	37.7 \pm 2.6##	36.1 \pm 1.9##
Muscle (GAS+TA)/ 100 g BW	1.68 \pm 0.01	1.64 \pm 0.03	1.80 \pm 0.09***	1.74 \pm 0.03	2.62 \pm 0.04	3.08 \pm 0.0**	3.35 \pm 0.11***	3.01 \pm 0.06**SS
PAT/BW (mg/g)	8.98 \pm 1.00	8.13 \pm 0.98	7.81 \pm 1.37	8.47 \pm 1.24	10.00 \pm 1.45	10.07 \pm 1.33	8.38 \pm 1.13*#	10.3 \pm 1.54 ^S
BAT/BW (mg/g)	1.31 \pm 0.26	1.73 \pm 0.30**	0.76 \pm 0.13***	1.43 \pm 0.13 ^{SS}	1.12 \pm 0.24	1.38 \pm 0.20*	0.89 \pm 0.11***	1.33 \pm 0.27 ^{SS}
Diaphragm/ BW (mg/g)	1.93 \pm 0.17	1.90 \pm 0.19	1.80 \pm 0.14	1.74 \pm 0.43	1.81 \pm 0.33	1.82 \pm 0.20	1.83 \pm 0.29	2.03 \pm 0.37
Heart/BW (mg/g)	3.35 \pm 0.30	3.34 \pm 0.36	3.48 \pm 0.10	3.43 \pm 0.23	3.37 \pm 0.30	3.41 \pm 0.34	3.40 \pm 0.23	3.59 \pm 0.27
Right ventricle/ total heart (%)	24.4 \pm 2.8	25.0 \pm 2.4	28.3 \pm 4.1*#	24.5 \pm 2.0 ^S	25.6 \pm 4.1	26.3 \pm 4.0	28.8 \pm 2.7	26.4 \pm 3.3

Los resultados se presentan como la media \pm desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como: * $p < 0.05$ vs. CTRL, ** $p < 0.001$ vs. CTRL, # $p < 0.05$ vs. COLD, ## $p < 0.001$ vs. COLD, $\$p < 0.05$ vs. HYPO, $\$\$p < 0.001$ vs. HYPO. BW, peso corporal; GAS, músculo gastrocnemio; TA, músculo tibial anterior; PAT, tejido adiposo perigonadal; BAT, tejido adiposo marrón. CTRL, control; COLD, frío intermitente; HYPO, hipoxia intermitente; COHY, frío + hipoxia intermitente.

En cuanto al tejido adiposo, se ha observado que la exposición a hipoxia intermitente de forma aislada provoca una disminución del índice BAT/BW, este cambio se pudo identificar ya a los 9 días de tratamiento y se mantuvo a lo largo de todo el experimento (Tabla 4). Por otro lado, el grupo COLD tras 9 días de ICE mostró un incremento significativo del índice BAT/BW respecto a los grupos CTRL, COLD e HYPO ($p < 0.001$, $p < 0.001$ y $p = 0.005$, respectivamente). Sin embargo, tras 21 días, los valores superiores del peso del BAT del grupo COLD únicamente fueron significativamente diferentes respecto a aquellos grupos no sometidos a frío (vs. CTRL, $p = 0.003$ y vs. HYPO, $p > 0.001$), postulando así al frío como el posible elemento responsable de la activación del BAT. En relación al peso del tejido adiposo perigonadal, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos durante los primeros días del estudio, pero tras 21 días, los animales del grupo HYPO mostraron una reducción significativa del índice PAT/BW con relación al resto de los grupos experimentales (Tabla 4).

Por otro lado, no se hallaron diferencias significativas entre los diferentes grupos ni en el peso del diafragma ni en el peso del corazón. Sin embargo, el índice ventricular derecho (calculado como la razón peso ventrículo derecho/peso total del corazón) fue significativamente superior en el grupo HYPO durante los primeros 9 días de HHI, mientras que, a los 21 días no se registraron cambios significativos entre los diferentes grupos (Tabla 4).

Finalmente, destacar que el índice de supervivencia de los animales fue del 100%, pudiendo por lo tanto afirmar, que nuestros procedimientos fueron seguros y que el grado de estrés que los diferentes tratamientos pudieron generar sobre los animales no tuvieron tal magnitud como para comprometer su viabilidad.

2.2. Parámetros hematológicos

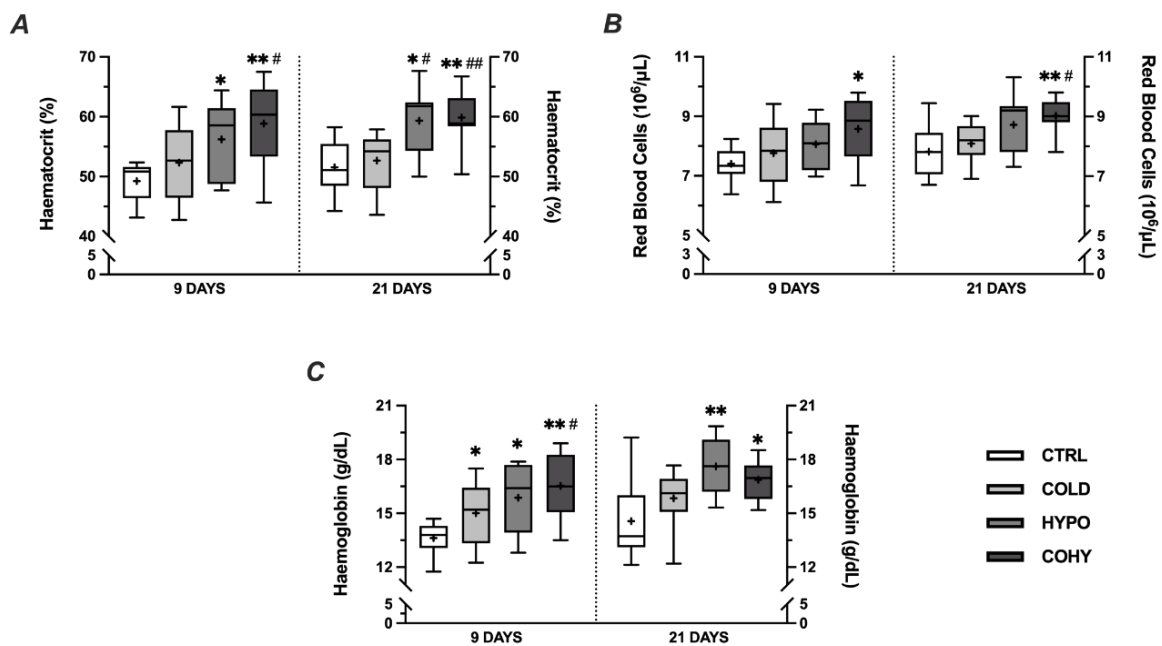


Figura 18: Parámetros hematológicos. (A) Hematocrito, (B) conteaje de glóbulos rojos, (C) concentración de hemoglobina. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como: *p<0.05 vs. CTRL, **p<0.001 vs. CTRL, #p<0.05 vs. COLD, ##p<0.001 vs. COLD, §p<0.05 vs. HYPO, §§p<0.001 vs. HYPO. Tamaño de la muestra: n=8-13 por grupo a cada punto temporal. CTRL, control; COLD, frío intermitente; HYPO, hipoxia intermitente; COHY, frío + hipoxia intermitente.

En la **Figura 18A-C** se muestran los resultados de los parámetros hematológicos relacionados con el transporte de oxígeno. Se puede observar que tanto a 9 como 21 días el grupo COLD muestra en los tres parámetros analizados (Htc, RBC y [Hb]) valores ligeramente superiores que el grupo CTRL. Sin embargo, debido a la gran dispersión que presentan los datos (ilustrado mediante una caja de gran tamaño), los resultados únicamente muestran diferencias estadísticamente significativas en [Hb] a 9 días (CTRL vs. COLD, $p=0.021$). El grupo HYPO por su parte, presentó tanto a 9 como a 21 días una [Hb] y un Htc significativamente superior que el grupo CTRL, y un Htc significativamente más elevado que el grupo COLD tras 21 días ($p=0.005$). Además, el grupo HYPO mostró un mayor número de RBC que los grupos CTRL y COLD, pero estas diferencias no alcanzaron a ser estadísticamente significativas (**Figura 18B**). Por último, el grupo COHY exhibió en los tres parámetros relacionados con el transporte de oxígeno valores superiores a los registrados en los demás grupos. Estos incrementos fueron estadísticamente significativos respecto a los grupos CTRL y COLD en Htc a 9 y 21 días, en RBC a 21 días y en [Hb] a 9 días, y diferentes únicamente respecto al grupo CTRL en RBC a 9 días ($p=0.004$) y en [Hb] a 21 días ($p=0.004$).

Tabla 5: Índices hematimétricos.

	9 days				21 days			
	CTRL n=11	COLD n=13	HYPO n=8	COHY n=12	CTRL n=9	COLD n=12	HYPO n=9	COHY n=11
MCV (fL)	66.7 ± 2.3	67.6 ± 2.1	68.6 ± 1.2	70.4 ± 3.8 ^{*#}	65.2 ± 2.6	65.2 ± 2.8	66.6 ± 1.0	66.5 ± 1.9
MHC (pg)	18.4 ± 0.9	18.8 ± 2.1	19.4 ± 0.5	19.6 ± 0.6	18.5 ± 1.6	19.1 ± 1.08	19.22 ± 0.9	18.68 ± 0.7
MCHC (g/dL)	27.7 ± 1.0	28.6 ± 1.2	28.3 ± 0.8	28.1 ± 1.1	27.5 ± 0.4	29.9 ± 1.5 [*]	29.0 ± 1.3 [*]	28.4 ± 1.2 [#]
WBC (10⁹/L)	7.0 ± 1.6	12.5 ± 1.5 [*]	10.9 ± 4.1 [*]	11.3 ± 4.4 [*]	6.4 ± 1.7	6.9 ± 2.1	10.4 ± 4.5 ^{*#}	6.8 ± 2.0 [§]
Platelets (10⁹/L)	522 ± 76	603 ± 224	392 ± 95 ^{*#}	406 ± 105 [#]	497 ± 139	587 ± 160	488 ± 103	451 ± 108

Los resultados se presentan como la media ± desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como: * $p<0.05$ vs. CTRL, # $p<0.05$ vs. COLD, § $p<0.05$ vs. HYPO. MCV, volumen corpuscular medio; MHC, hemoglobina corpuscular media; MCHC, concentración de hemoglobina corpuscular media; WBC, glóbulos blancos. CTRL, control; COLD, frío intermitente; HYPO, hipoxia intermitente; COHY, frío + hipoxia intermitente.

En la **Tabla 5**, se pueden apreciar los índices hematimétricos y el conteo de glóbulos blancos (WBC) y plaquetas de los cuatro grupos. En cuanto a los índices hematimétricos, únicamente se observaron diferencias en MCV a 9 días, donde el grupo COHY presentó valores significativamente superiores que el grupo CTRL y COLD ($p=0.001$ y $p=0.009$, respectivamente), y en el parámetro MHCH a 21 días, donde los grupos COLD e HYPO mostraron valores superiores que el grupo CTRL ($p<0.001$ y $p=0.009$, respectivamente), mientras que COHY exhibió un promedio menor que el grupo COLD ($p=0.009$). Todos los grupos de intervención mostraron promedios de WBC superiores al grupo CTRL a 9 días, mientras que, en el muestreo realizado a 21 días el grupo HYPO presentó mayores cantidades de WBC que el resto de los grupos experimentales. Por último, a 9 días el grupo HYPO presentó un conteo de plaquetas significativamente menor que el grupo CTRL ($p=0.003$), y los dos grupos expuestos a hipoxia (HYPO y COHY) mostraron un volumen plaquetario inferior al grupo COLD ($p=0.002$ en ambos casos). Sin embargo, a los 21 días los cambios registrados en el volumen de plaquetas se disiparon.

2.3 Área transversal de la fibra y diámetro de Feret

En la **Figura 19A-D** se representa el promedio de FCSA de cada tipo de fibra. Todos los grupos experimentales presentaron tras 9 días una ligera disminución del FCSA respecto al grupo CTRL en las fibras SO, siendo además esta disminución significativa entre el grupo CTRL y COHY ($p=0.049$). Sin embargo, tras 21 días, los grupos CTRL y COLD exhibieron un FCSA similar (3314 ± 631 vs. $3400 \pm 504 \mu\text{m}^2$), mientras que los grupos sometidos a hipoxia (HYPO y COHY) mostraron una clara tendencia no significativa hacia fibras SO de menor tamaño (**Figura 19A**). El diámetro de Feret, entendido como la distancia más larga entre dos puntos cualesquiera a lo largo del límite de una sección, se muestra en la **Figura 19E-H** y se representa al igual que el FCSA por tipos de fibra. El diámetro de Feret de las fibras SO mostró un comportamiento muy similar al observado en el área de las fibras, así, a los 9 días los grupos experimentales COLD, HYPO y COHY mostraron un diámetro de Feret menor que el grupo CTRL ($p=0.095$, $p=0.043$ y $p=0.007$, respectivamente), mientras que tras 21 días los grupos HYPO y COHY exhibieron un diámetro de Feret menor que los otros dos grupos, pero sin alcanzar diferencias significativas (**Figura 19E**).

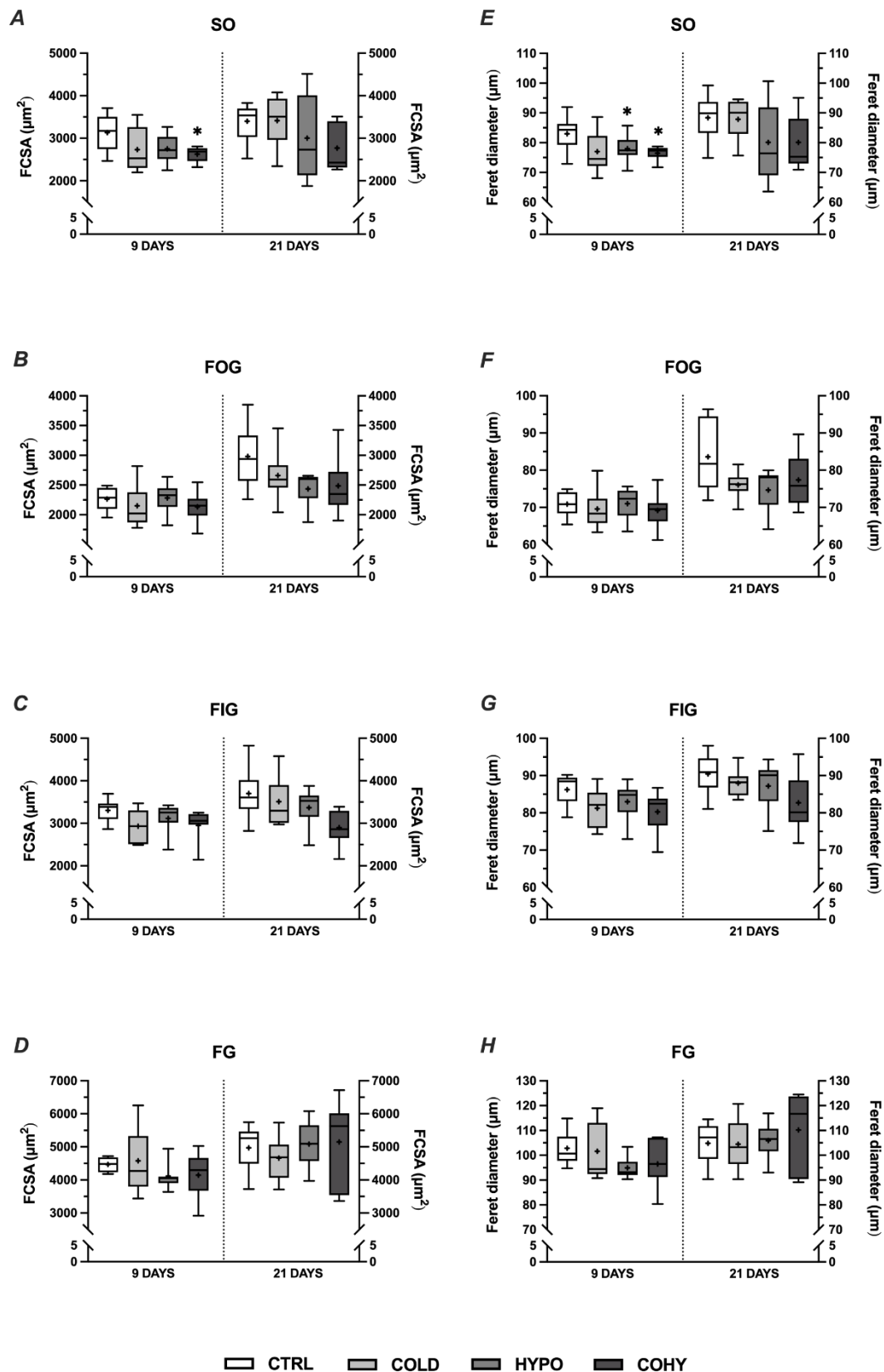


Figura 19: Morfometría de los diferentes tipos de fibras del músculo gastrocnemio. (A-D) Área transversal de las fibras (FCSA), (E-H) diámetro de Feret. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como: * $p < 0.05$ vs. CTRL. Tamaño de la muestra: $n=6$ por grupo a cada punto temporal. SO, fibras lentas oxidativas; FOG, fibras rápidas oxidativas glucolíticas; FIG, fibras rápidas intermedias glucolíticas; FG, fibras rápidas glucolíticas; CTRL, control; COLD, frío intermitente; HYPO, hipoxia intermitente; COHY, frío + hipoxia intermitente.

Las fibras FOG y FIG mostraron un comportamiento muy similar ante los diferentes tratamientos en el análisis realizado tras 9 días de intervención (**Figura 19B y C**). Las fibras sometidas a frío intermitente (COLD y COHY) sufrieron una ligera disminución no significativa del FCSA, mientras que las fibras del grupo HYPO no mostraron casi variaciones respecto al grupo CTRL. Sin embargo, tras 21 días, todos los grupos intervenidos presentaron un promedio del FCSA menor que el grupo CTRL, aunque con algunas diferencias, ya que el grupo COLD exhibió una ligera disminución de FCSA, mientras que las fibras de los grupos hipóxicos (HYPO y COHY) redujeron su tamaño de forma considerable (entre un 9% y 21%) respecto al grupo CTRL, aunque sin llegar a mostrar diferencias significativas. Una vez más, los registros obtenidos del diámetro de Feret en las fibras FOG y FIG, confirman que durante la exposición al frío y/o la hipoxia la reducción del tamaño de las fibras está acompañada por una tendencia hacia una forma más redondeada de la sección transversal de las fibras (**Figura 19F y G**).

Como se observa en la **Figura 19D** los grupos HYPO y COHY mostraron a los 9 días una tendencia no significativa hacia fibras FG de menor tamaño que las de los grupos CTRL y COLD, mientras que, a los 21 días estas diferencias desaparecieron. El diámetro de Feret mostró unos resultados muy similares a los registrados en el FCSA de las fibras FG, y por lo tanto, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos en ningún punto temporal (**Figura 19H**).

2.4. Capilarización individual de las fibras

El grado de irrigación de una fibra está marcado por el número de capilares que la rodea, pero, sobre todo, por el número de capilares que la contacta en relación al área de la sección transversal de la propia fibra. En el presente estudio hemos podido observar que, tras la exposición al frío y/o la hipoxia durante 9 días, todos los tipos de fibras mostraron una tendencia a disminuir el promedio de NCF en comparación con las fibras del grupo CTRL (**Figura 20A-D**). Esta disminución del NCF es más pronunciada en las fibras FOG, FIG y FG del grupo COHY, llegando a mostrarse diferencias significativas respecto al grupo CTRL en las fibras FG ($p=0.003$) (**Figura 20B-D**). Además, el grupo HYPO, también mostró una destacada reducción en el NCF respecto al grupo CTRL en los

tipos de fibras SO y FG ($p=0.089$ y $p=0.022$, respectivamente) (**Figura 20A y D**). Sin embargo, una vez transcurridos 21 días de intervención pudimos observar en el grupo COLD una ligera tendencia, aunque no significativa, a aumentar su promedio de NCF respecto al grupo CTRL en todos los tipos de fibras. Mientras que, por el contrario, el grupo HYPO mostró una disminución, tampoco estadísticamente significativa, en el NCF en las fibras de carácter oxidativo (**Figura 20A-C**), y el grupo COHY presentó valores muy similares a los registrados en el grupo CTRL en todos los tipos de fibras.

El NCF es un parámetro que se encuentra directamente relacionado con el tamaño de las fibras. En el presente trabajo, con la finalidad de corregir la influencia del tamaño de las fibras sobre el número de capilares, se ha añadido el parámetro CCA, es decir, un índice que nos indica la relación directa entre los capilares y el área de fibra que estos irrigan (**Figura 20E-H**). En el análisis realizado a los 9 días de estudio, no se identificaron diferencias significativas entre los diferentes grupos en ninguno de los tipos de fibras, pese a que el grupo HYPO pareciera mostrar una pequeña tendencia hacia valores más bajos. Sin embargo, a los 21 días, el grupo COLD mostró una pequeña tendencia hacia valores de CCA más elevados que el grupo CTRL en todos los tipos de fibras. Por su parte, el grupo HYPO también mostró valores ligeramente superiores al grupo CTRL en las fibras SO y FOG (incremento del 10% en ambos casos) (**Figura 20E y F**), mientras que el grupo COHY mostró un destacado incremento del CCA en las fibras SO y FOG respecto al grupo CTRL ($p=0.075$ y $p=0.004$, respectivamente) (**Figura 20E y F**) y en las fibras FIG respecto al resto de los grupos (**Figura 20G**).

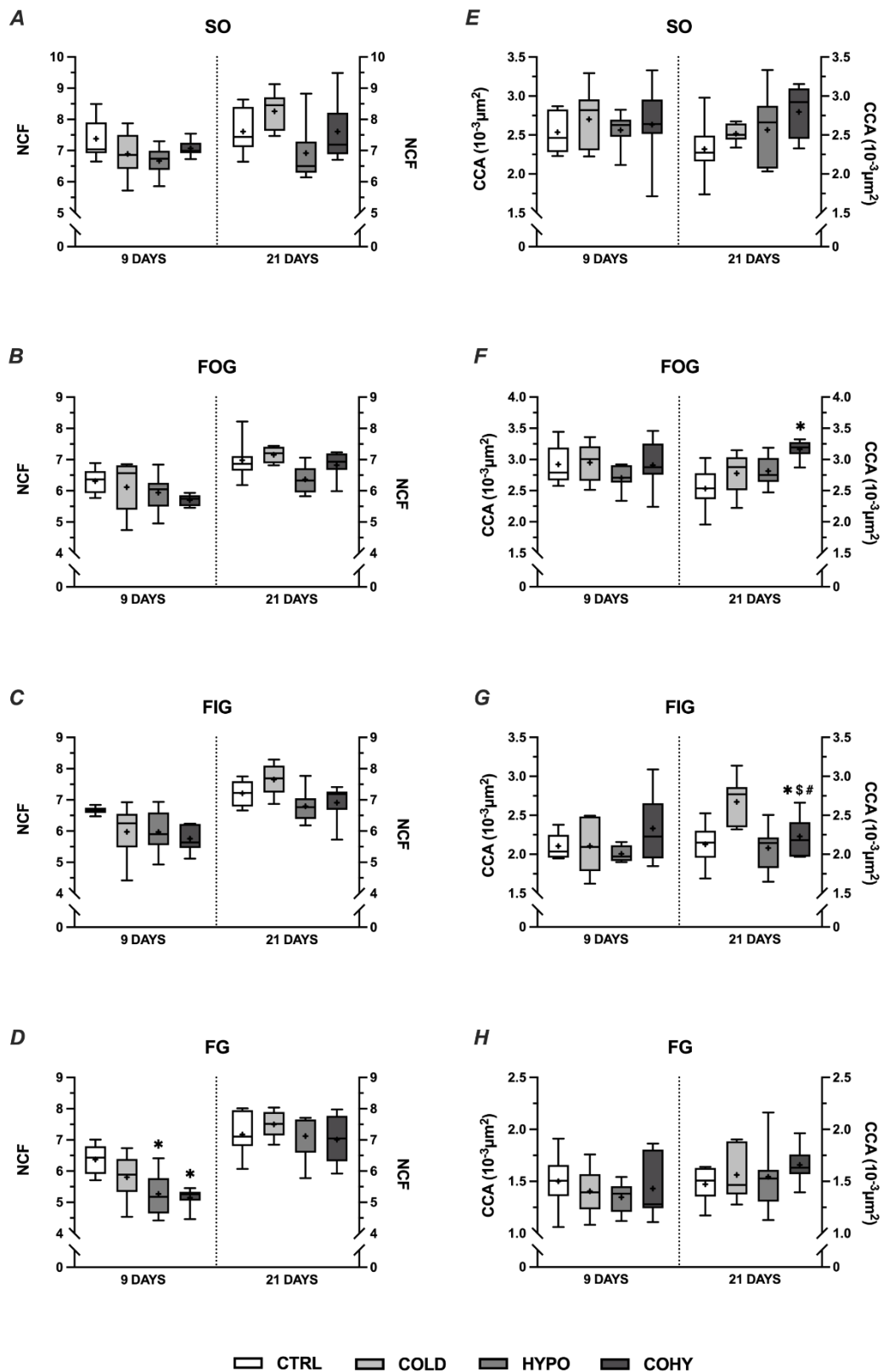


Figura 20: Capilarización individual de las fibras del músculo gastrocnemio. (A-D) Número de capilares por fibra (NCF), (E-H) índice de capilarización fibrilar (CCA). Las diferencias estadísticamente significativas se indican como: * $p < 0.05$ vs. CTRL, # $p < 0.05$ vs. COLD, \$ $p < 0.05$ vs. HYPO. Tamaño de la muestra: $n = 6$ por grupo a cada punto temporal. SO, fibras lentas oxidativas; FOG, fibras rápidas oxidativas glucolíticas; FIG, fibras rápidas intermedias glucolíticas; FG, fibras rápidas glucolíticas; CTRL, control; COLD, frío intermitente; HYPO, hipoxia intermitente; COHY, frío + hipoxia intermitente.

2.5. Densidad de fibras, densidad capilar y el cociente capilares por fibra

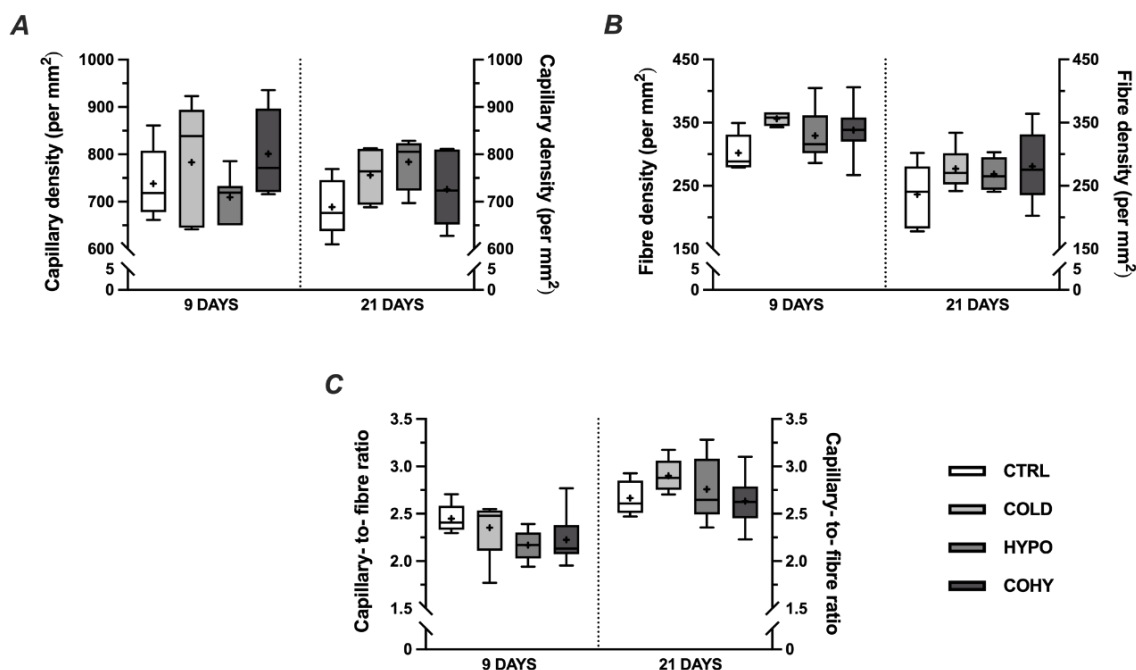


Figura 21: Parámetros morfométricos y de capilarización global del músculo gastrocnemio. (A) Densidad capilar, (B) densidad de fibras, (C) cociente capilares por fibra. Tamaño de la muestra: n=6 por grupo a cada punto temporal. CTRL, control; COLD, frío intermitente; HYPO, hipoxia intermitente; COHY, frío + hipoxia intermitente.

En el día 9 del estudio, los dos grupos sometidos a frío (COLD y COHY) mostraron un pequeño incremento en la CD, mientras que, a los 21 días todos los grupos mostraron un ligero incremento no significativo en la capilarización global del músculo (**Figura 21A**). Como se puede observar en la **Figura 21B** todos los grupos sometidos a algún tratamiento incrementaron de forma no significativa la densidad de fibras tanto a 9 como a 21 días. Este aumento de la FD está correlacionado con la disminución del FCSA observado en las fibras de los grupos experimentales, es decir, los grupos COLD, HYPO y COHY mostraron de forma global fibras de menor tamaño y, por lo tanto, la densidad de fibras observada para un área determinada de músculo fue mayor. Por último, la **Figura 21C** muestra el cociente C/F, es decir, la relación entre la densidad de capilares y la densidad fibras. Tras 9 días de intervención, los grupos HYPO y COHY mostraron un menor índice C/F que el grupo CTRL. Sin embargo, a los 21 días, los grupos HYPO y COHY mostraron valores muy similares a los registrados en el grupo CTRL, mientras que el grupo COLD mostró un tímido incremento del cociente C/F (**Figura 21C**).

2.6. Distribución de los diferentes tipos de fibras

Debido a su alta plasticidad, las fibras musculares pueden cambiar su fenotipo en respuesta a cambios hormonales y neurales. Es por ello, que tras exposiciones a diferentes estímulos no es descabellado pensar que las fibras musculares puedan presentar cambios en su fenotipo y en su capacidad oxidativa. En la **Figura 22** se pueden apreciar los porcentajes de cada tipo de fibra por grupos experimentales. A los 9 días de estudio, el porcentaje de fibras SO no presentó cambios en ninguno de los grupos, representando aproximadamente el 22% del total de fibras. Así mismo, el grupo COLD incrementó significativamente el porcentaje de fibras FOG respecto al grupo CTRL (39% vs. 32%, $p=0.046$), mientras que el grupo COHY lo redujo respecto a los grupos COLD e HYPO (COHY=34% vs. COLD=39% y vs. HYPO=38%, $p=0.017$ y $p=0.036$, respectivamente). En el muestreo realizado a 21 días, el grupo HYPO mostró una reducción significativa del 10% en el tipo de fibras SO respecto al grupo CTRL, pero, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos ni en las fibras FOG, que promediaron un porcentaje de entre el 31 y el 35%, ni en las fibras FIG (15-19%), ni FG (24-30%).

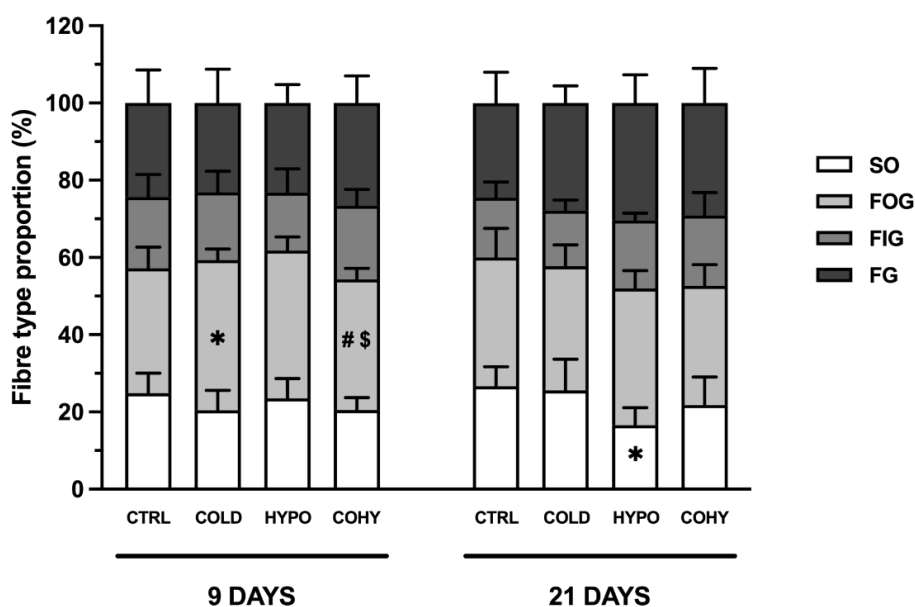


Figura 22: Distribución de los diferentes tipos de fibras en el músculo gastrocnemio. Los resultados se presentan como la media \pm desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como: * $p<0.05$ vs. CTRL, # $p<0.05$ vs. COLD, $\$p<0.05$ vs. HYPO. Tamaño de la muestra: $n=6$ por grupo a cada punto temporal. SO, fibras lentas oxidativas; FOG, fibras rápidas oxidativas glucolíticas; FIG, fibras rápidas intermedias glucolíticas; FG, fibras rápidas glucolíticas; CTRL, control; COLD, frío intermitente; HYPO, hipoxia intermitente; COHY, frío + hipoxia intermitente.

2.7. Vía de señalización HIF-1 α

La alta presencia de HIF-1 α en el tejido muscular de forma fisiológica y su expresión constitutiva en el organismo hace que el uso de HIF-1 α como marcador de hipoxia muscular genere dudas y controversias. Es por ello, que en el presente trabajo se ha realizado la medición de HIF-1 α junto con la medición de dos de las proteínas que sobre-regula en situación de hipoxia (GLUT1 (*Glucose Transporter 1*) y VEGF) (**Figura 23**).

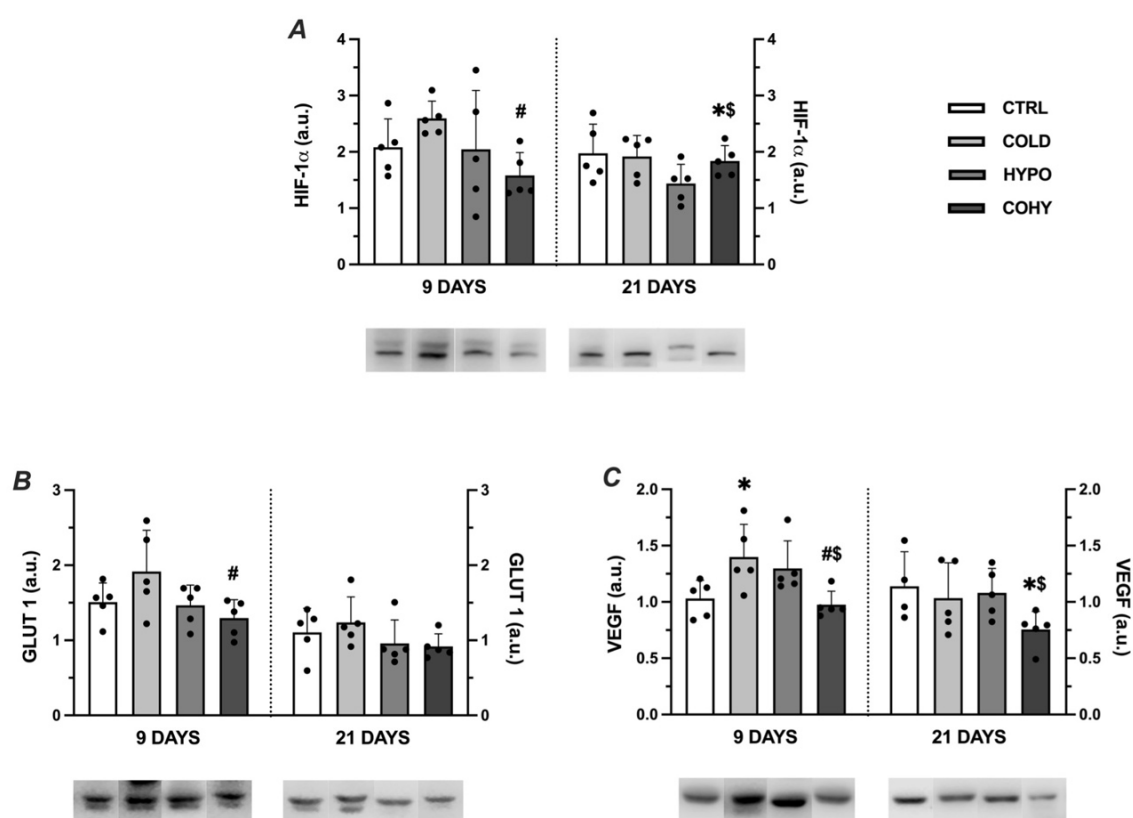


Figura 23: Expresión de proteínas de la vía de señalización del factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α). (A) HIF-1 α , (B) transportador de glucosa 1 (GLUT1), (C) factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). Los resultados se presentan como la media \pm desviación estándar y son expresados en unidades arbitrarias (a.u.). Las diferencias estadísticamente significativas se indican como: * $p < 0.05$ vs. CTRL, # $p < 0.05$ vs. COLD, \$ $p < 0.05$ vs. HYPO. Los puntos representan los valores de cada muestra. Tamaño de la muestra: $n = 4-5$ por grupo a cada punto temporal. CTRL, control; COLD, frío intermitente; HYPO, hipoxia intermitente; COHY, frío + hipoxia intermitente.

Tras 9 días de intervención, el grupo COLD mostró incrementos en la expresión de las tres proteínas estudiadas, mostrando diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo COHY en todas ellas (**Figura 23A-C**), y respecto al grupo CTRL en la expresión de VEGF (**Figura 23C**). Además, los incrementos de HIF-1 α y GLUT1 del grupo

COLD respecto al grupo CTRL son evidentes a 9 días (25% y 27%, respectivamente) (**Figura 23A y B**), a pesar de no ser estadísticamente significativos. Por otro lado, durante los primeros días de exposición a HHI, el grupo HYPO mostró incrementos en la expresión de VEGF respecto a los grupos CTRL y COHY ($p=0.066$ y $p=0.031$, respectivamente) (**Figura 23C**). Sin embargo, a los 21 días no se observaron cambios significativos entre los grupos, a excepción de una reducción significativa en la expresión de VEGF del grupo COHY respecto a los grupos CTRL e HYPO (**Figura 23C**).

Bloque 3

3. **Bloque 3: El frío y la hipoxia y su efecto sobre la regeneración del tejido muscular**

3.1. Evaluación de la función muscular

Para evaluar la evolución de la lesión muscular a lo largo del tiempo y el efecto de los diferentes tratamientos utilizados sobre el proceso de regeneración muscular, se llevó a cabo una comparación *in vivo* de la capacidad contráctil del músculo gastrocnemio (GAS) derecho (lesionado) y del contralateral izquierdo (no lesionado) para cada animal (*paired test*).

Como se puede observar en la **Figura 24**, el GAS lesionado del grupo CTRL, recuperado pasivamente de la lesión muscular, mostró reducciones significativas en la capacidad de generar fuerza (fuerza pico: 9 días: $p=0.012$; 21 días: $p=0.049$ y fuerza tetánica: 9 días: $p=0.034$; 21 días: $p=0.024$) (**Figura 24A-D**) y en la LFF tanto a 9 como a 21 días (**Figura 24E-F**). Mientras que no se observaron cambios entre el GAS lesionado y no lesionado en los parámetros CT (9 días: 38 ± 12 vs. 39 ± 10 ms, $p=0.540$; 21 días: 44 ± 6 vs. 46 ± 8 ms; $p=0.557$) y HRT (9 días: 64 ± 15 vs. 68 ± 16 ms; $p=0.284$; 21 días: 73 ± 12 vs. 77 ± 13 ms; $p=0.469$) en ninguno de los puntos temporales estudiados (datos no mostrados en gráfico).

En cuanto al grupo sometido a ICE (COLD), este mostró deficiencias en la capacidad contráctil del músculo lesionado en todos los parámetros estudiados a 9 días (PF: $p=0.010$; TetF: $p<0.001$; CT: $p=0.037$; HRT: $p=0.040$; LFF: $p=0.022$). Sin embargo, tras 21 días de tratamiento con frío intermitente, el músculo lesionado únicamente presentó pequeñas reducciones no significativas en la fuerza respecto al músculo no lesionado (PF: $p=0.111$; TetF: $p<0.318$; CT: $p=0.942$; HRT: $p=0.958$; LFF: $p=0.772$).

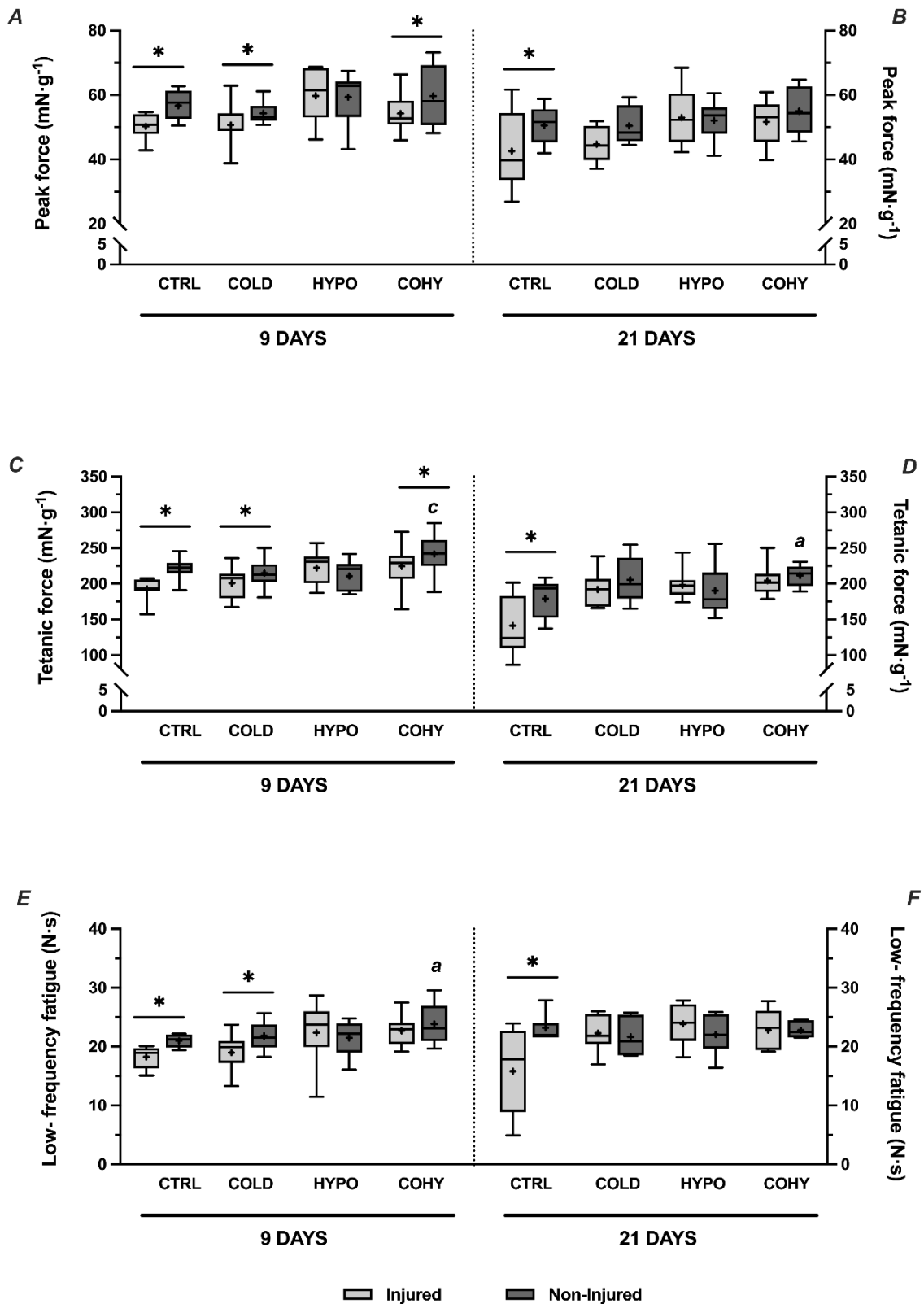


Figura 24: Parámetros de funcionalidad muscular evaluados en el músculo gastrocnemio post-lesión. (A-B) Fuerza pico, (C-D) fuerza tetánica, (E-F) fatiga baja frecuencia. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como: * $p < 0.05$ vs. el músculo gastrocnemio contralateral no lesionado (non-injured), ^a $p < 0.05$ vs. CTRL, ^c $p < 0.05$ vs. HYPO. Tamaño de la muestra: $n = 6-9$ por grupo a cada punto temporal. CTRL, control; COLD, frío intermitente; HYPO, hipoxia intermitente; COHY, frío + hipoxia intermitente.

Tras 9 días de HHI, los animales del grupo HYPO no mostraron ningún tipo de diferencia entre el músculo lesionado y no lesionado en los parámetros PF, CT, TetF y fatiga a baja frecuencia ($p=0.842$, $p=0.890$, $p=0.227$ y $p=0.610$, respectivamente), aunque sí que se observó un incremento significativo en el HRT del músculo lesionado (76 ± 19 vs. 81 ± 16 ms, $p=0.009$) (datos no mostrados en el gráfico). En los resultados obtenidos 21 días post-lesión se observó una completa recuperación de la función muscular de los músculos lesionados del grupo HYPO, ya que en todos los parámetros estudiados se registraron valores muy similares en ambas patas (**Figura 24B, D y F**).

Por su parte, el grupo COHY mostró a los 9 días de sufrir la lesión reducciones significativas de la PF ($p=0.023$) y TetF ($p=0.005$) en el GAS lesionado (**Figura 24A y C**), mientras que no se observaron diferencias entre patas en los parámetros CT (43 ± 8 vs. 41 ± 7 ms, $p=0.308$) (datos no mostrados en gráfico), HRT (72 ± 14 vs. 70 ± 12 ms, $p=0.545$) (datos no mostrados en gráfico) y en la resistencia a la fatiga a baja frecuencia ($p=0.182$) (**Figura 24E**). Sin embargo, la exposición al frío y a la hipoxia durante 21 días favoreció la restauración de la capacidad para generar fuerza del músculo lesionado, eliminándose las diferencias existentes entre el GAS derecho y el izquierdo en los parámetros PF ($p=0.655$) y TetF ($p=0.420$) (**Figura 24B y D**).

Junto a los mencionados parámetros funcionales, se compararon los pesos de los gastrocnemios lesionados y no lesionados (*Paired test*). No se observaron diferencias significativas en la relación peso gastrocnemio/peso corporal entre el músculo no lesionado y el lesionado ni a 9 días ni a 21 días entre ninguno de los grupos experimentales (**Tabla 6**).

Finalmente, para determinar si los diferentes tratamientos afectaron a la fuerza muscular, se comparó la capacidad para generar fuerza entre los músculos no lesionados de los diferentes grupos. Únicamente se observaron diferencias significativas entre el grupo COHY y el HYPO en la fuerza tetánica a 9 días ($p=0.032$) y entre el grupo COHY y CTRL a 21 días ($p=0.013$). Además, también se registró una resistencia a la fatiga a baja frecuencia mayor en el grupo COHY en comparación con el grupo CTRL en los primeros 9 días de intervención ($p=0.048$).

Tabla 6: Pesos de los gastrocnemios lesionados y contralaterales no lesionados de los diferentes grupos experimentales.

		Gastrocnemius / Body weight (‰)		
		Injured	Non-Injured	p-value
9 DAYS	CTRL	6.70 ± 0.31	6.54 ± 0.24	0.352
	COLD	6.67 ± 0.50	6.60 ± 0.51	0.602
	HYPO	6.92 ± 0.33	6.86 ± 0.31	0.201
	COHY	6.84 ± 0.36	6.71 ± 0.35	0.190
21 DAYS	CTRL	7.02 ± 0.33	6.92 ± 0.48	0.488
	COLD	6.66 ± 0.25	6.34 ± 0.34	0.096
	HYPO	7.11 ± 0.33	6.90 ± 0.31	0.061
	COHY	6.61 ± 0.46	6.59 ± 0.31	0.899

Los resultados se presentan como la media ± desviación estándar. CTRL, control; COLD, frío intermitente; HYPO, hipoxia intermitente; COHY, frío + hipoxia intermitente. n=6-9 por grupo a cada punto temporal.

3.1.1. Distribución de los diferentes tipos de fibras y FCSA

Junto a la evaluación de la función muscular decidimos analizar los posibles cambios en los tipos de fibras y en el área transversal de fibras tras la aplicación de los diferentes tratamientos, ya que la fuerza y la resistencia a la fatiga de un músculo están directamente relacionados tanto con la velocidad de contracción de las fibras como con su área transversal. Teniendo en cuenta que el régimen de contracción de las fibras influye de forma directa en la capacidad de generar fuerza, en este bloque las fibras musculares han sido estudiadas de acuerdo con su velocidad de contracción, es decir, en función de si son fibras lentas (fibras tipo I) o fibras rápidas (fibras tipo II).

En la **Figura 25** se presentan la composición, el FCSA y las frecuencias relativas de distribución de las fibras musculares clasificadas en función de su velocidad contráctil (tipo I o tipo II) tanto a 9 (**Figura 25A, C, E y G**) como a 21 días (**Figura 25B, D, F y H**).

No se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos en la distribución de fibras a 9 días, mientras que a 21 días de intervención el grupo HYPO mostró una reducción significativa de las fibras tipo I. En cuanto al área transversal de las fibras, se puede observar como a 9 días de intervención (**Figura 25C**) todos los grupos experimentales sometidos a algún tratamiento mostraron una tendencia no significativa hacia fibras de menor tamaño. Sin embargo, a 21 días, las fibras tanto tipo I como tipo II de los grupos CTRL y COLD exhibieron un FCSA muy similar, mientras que los grupos HYPO y COHY mostraron una reducción no significativa en el FCSA, siendo esta además más destacada en las fibras tipo I o fibras de contracción lenta (**Figura 25D**).

Por último, las **Figuras 25E-H** nos muestran la distribución o frecuencia de cada tipo de fibra en función de su FCSA. En el análisis realizado a los 9 días de estudio hemos podido observar que, a pesar de no haber diferencias significativas en las fibras tipo I, el grupo CTRL parece mostrar una curva de frecuencia ligeramente más desplazada hacia la derecha en comparación con el resto de grupos (**Figura 25E**), mientras que las curvas de frecuencia son prácticamente iguales en todos los grupos cuando hablamos de las fibras tipo II (**Figura 25G**). A los 21 días, en concordancia con lo observado en los valores de FCSA, los grupos CTRL y COLD muestran unas curvas de frecuencia de fibras tipo I más aplanadas y ligeramente desplazadas hacia la derecha, indicando la presencia de mayores cantidades de fibras de mayor tamaño en comparación con los grupos HYPO y COHY, aunque estas diferencias no son significativas (**Figura 25F**). En cuanto a las fibras tipo II, al igual que lo observado a 9 días, las curvas de frecuencia son prácticamente iguales en todos los grupos experimentales, indicando la presencia de fibras de muy similares tamaños en todos los grupos (**Figura 25H**).

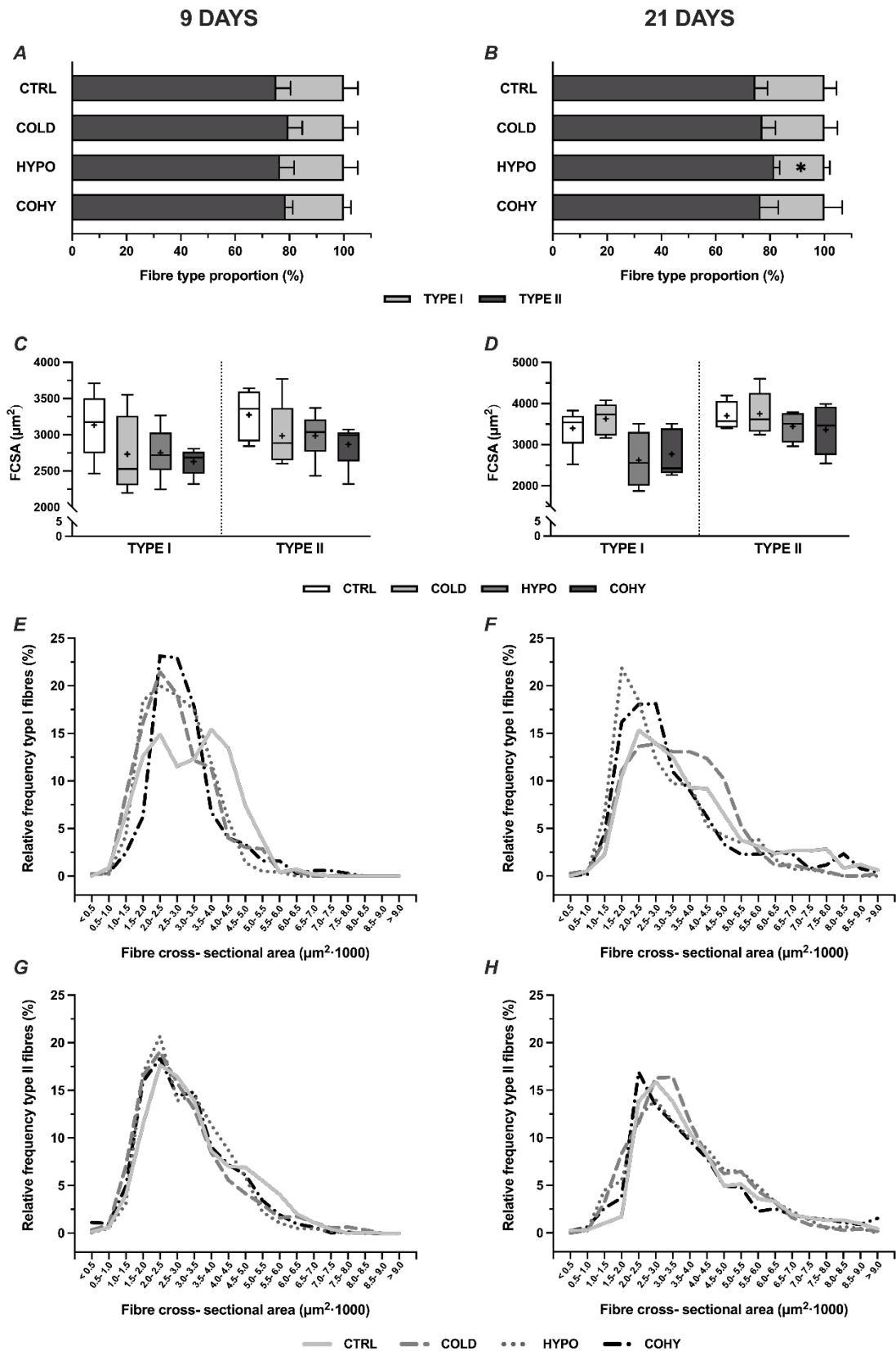


Figura 25: Distribución y área transversal de las fibras tipo I y tipo II en el músculo gastrocnemio. (A-B) Proporción de cada tipo de fibra, (C-D) área transversal de las fibras (FCSA), (E-H) frecuencia relativa de cada tipo de fibra en relación a su área transversal. Tamaño de la muestra: n=6 por grupo a cada punto temporal. CTRL, control; COLD, frío intermitente; HYPO, hipoxia intermitente; COHY, frío + hipoxia intermitente.

3.2. Evolución histológica de la lesión

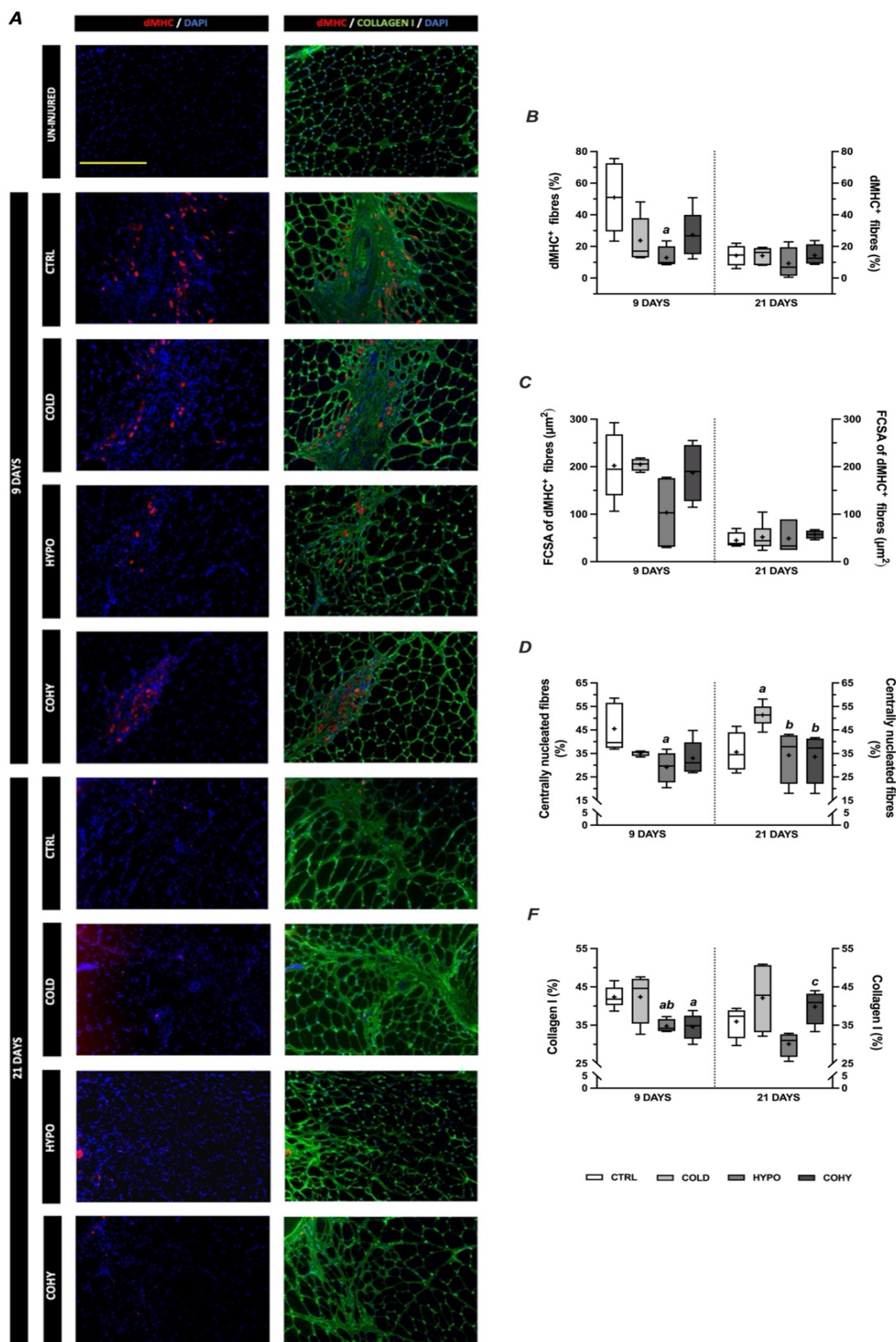


Figura 26: Resultados de la evolución histológica de la lesión muscular. (A) Imágenes representativas de las tinciones musculares, (B) % de fibras positivas en miosina del desarrollo (dMHC⁺), (C) área transversal de las fibras positivas en dMHC, (D) % de fibras que presentan núcleos centrales, (E) % de colágeno I. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como: a, $p < 0.05$ vs. CTRL; b, $p < 0.05$ vs. COLD; c, $p < 0.05$ vs. HYPO. La barra representa 100 μ m. Tamaño de la muestra: $n = 4-5$ por grupo a cada punto temporal. dMHC, miosina del desarrollo; FCSA, área transversal de la fibra; CTRL, control; COLD, frío intermitente; HYPO, hipoxia intermitente; COHY, frío + hipoxia intermitente.

Como se puede apreciar en la **Figura 26A**, durante el proceso de regeneración muscular podemos encontrar en el lugar de la lesión fibras musculares positivas en miosina del desarrollo. En el grupo CTRL, 9 días después de la lesión, aproximadamente el 51% de las fibras musculares presentes en el lugar de la lesión eran positivas en dMHC, mientras que este número disminuyó hasta el 15% el día 21 post-lesión, como consecuencia de la conversión natural de estas fibras en fibras MHC-I o MHC-II fruto de la maduración (**Figura 26B**). Los dos grupos sometidos a frío, COLD y COHY, mostraron un 50% menos de fibras positivas en dMHC que el grupo CTRL en el día 9 de recuperación, pero sin alcanzar diferencias significativas ($p=0.104$ y $p=0.081$, respectivamente). Sin embargo, tras 21 días sus valores fueron igualándose a los registrados en el grupo CTRL, encontrándose todos los grupos cercanos al 15% de fibras positivas en dMHC (**Figura 26B**). Finalmente, el grupo HYPO mostró menos del 15% del total de las fibras de la zona lesionada positivas en dMHC tanto a 9 como a 21 días. De esta forma, el grupo HYPO presentó una disminución significativa de fibras positivas en dMHC a 9 días respecto al grupo CTRL ($p=0.004$), mientras que, a los 21 días el porcentaje de fibras positivas encontradas en el lugar de la lesión es muy similar en todos los grupos experimentales (**Figura 26B**).

En cuanto al FCSA de las fibras positivas en dMHC (**Figura 26C**), el grupo HYPO presentó fibras de menor tamaño que el resto de los grupos tras 9 días, aunque estas diferencias únicamente fueron significativas entre los grupos HYPO y COLD ($p=0.050$). Contrariamente, 21 días después de la lesión no se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales (**Figura 26C**).

A 9 días, todos los grupos tratados presentaron un menor porcentaje de fibras con núcleos centrales que el grupo CTRL, siendo estas diferencias significativamente diferentes entre los grupos HYPO y CTRL (29% vs. 45%, $p=0.006$) (**Figura 26D**). Sin embargo, 21 días post-lesión los grupos CTRL, HYPO y COHY mostraron porcentajes similares de fibras con núcleos centrales (alrededor del 35%), mientras que el grupo COLD mostró presencia de núcleos centrales en cerca del 50% del total de las fibras de la zona lesionada, siendo este mayor porcentaje estadísticamente superior respecto a los otros tres grupos (**Figura 26D**).

Los grupos sometidos a hipoxia intermitente, HYPO y COHY, presentaron una menor deposición de colágeno I en la zona de la lesión que el grupo CTRL y COLD 9 días post-lesión. Por el contrario, tras 21 días de tratamientos únicamente el grupo HYPO consiguió modular la deposición de colágeno I, presentando valores inferiores que los grupos CTRL, COLD y COHY ($p=0.126$; $p=0.072$; $p=0.032$, respectivamente) (**Figura 26E**).

3.3. Respuestas moleculares

La masa muscular y los procesos de regeneración muscular son regulados a través de diferentes proteínas y vías de señalización que se activan o suprimen ante la presencia de diferentes estímulos. Proteínas como AMPK y la vía de señalización Akt/mTOR juegan un papel importante tanto en el mantenimiento de la masa muscular como en la regeneración muscular y es por ello que han sido analizadas en el presente trabajo.

3.3.1. Akt

Como se puede observar en la **Figura 27A** el grupo COHY mostró una reducción significativa respecto al grupo CTRL en la expresión de la proteína Akt en ambos músculos gastrocnemios tras 9 días de hipoxia y frío intermitente ($p=0.015$ y $p=0.026$). En cuanto a la expresión de la forma fosforilada de Akt (pSer⁴⁷³Akt), los grupos HYPO y COHY presentaron un incremento significativo en comparación con el grupo CTRL en la expresión de esta proteína tanto en el músculo lesionado ($p=0.004$, en ambos casos) como en el no lesionado ($p=0.010$ y $p=0.006$), mientras que el grupo COLD lo hizo exclusivamente en la pata no lesionada ($p=0.020$) (**Figura 27C**). En esta misma línea, todos los grupos intervenidos mostraron en ambas patas un incremento significativo del cociente pSer⁴⁷³Akt/Akt total respecto al grupo CTRL, llegándose a duplicar los valores registrados en el GAS lesionado del grupo COLD, e incluso a triplicarse en el caso del GAS no lesionado del grupo COLD y de ambos gastrocnemios de los grupos HYPO y COLD (**Figura 27E**).

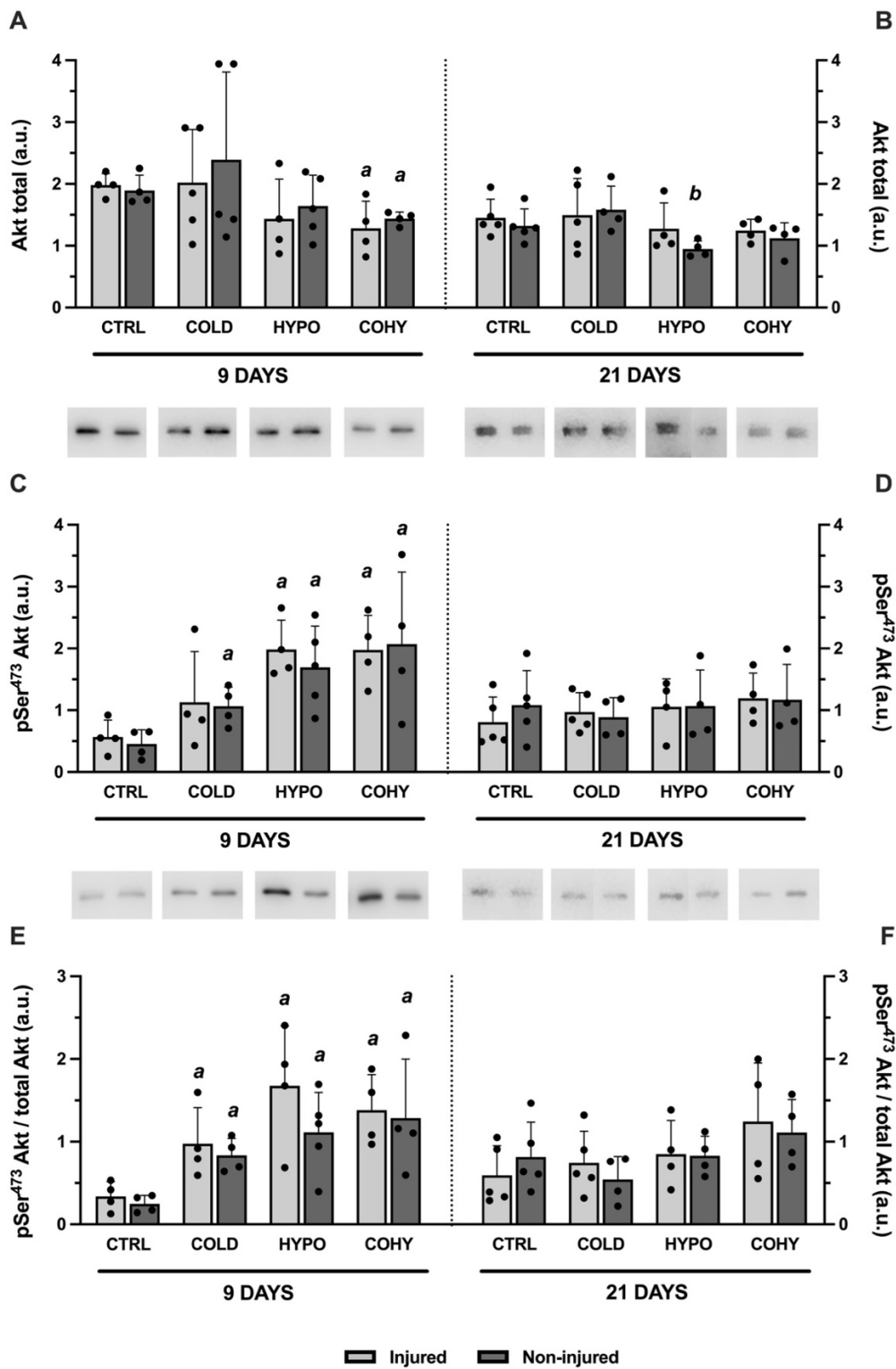


Figura 27: Expresión de las proteínas Akt y pSer⁴⁷³Akt en el músculo gastrocnemio lesionado (injured) y no lesionado (non-injured). (A-B) Akt total, (C-D) pSer⁴⁷³Akt, (E-F) ratio pSer⁴⁷³Akt/Akt total. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como: a, p<0.05 vs. CTRL; b, p<0.05 vs. COLD; c, p<0.05 vs. HYPO entre los músculos de la misma condición. Los puntos representan los valores de cada muestra. Tamaño de la muestra: n=4-5 por grupo a cada punto temporal. CTRL, control; COLD, frío intermitente; HYPO, hipoxia intermitente; COHY, frío + hipoxia intermitente.

En cuanto a los resultados obtenidos tras 21 días de intervención, destacar que el grupo HYPO presentó una reducción significativa de la expresión de la proteína Akt respecto al grupo COLD en el gastrocnemio no lesionado ($p=0.006$), mientras que el resto de los grupos no mostraron diferencias entre ellos (**Figura 27B**). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en la forma fosforilada de Akt (**Figura 27D**), ni tampoco en la relación entre la forma fosforilada y la forma nativa en la medición realizada el día 21 de estudio (**Figura 27F**).

3.3.2. mTOR

En relación a mTOR, tras 9 días de intervención el GAS no lesionado del grupo COLD presentó valores significativamente menores que los GAS no lesionados de los otros tres grupos, además, el músculo lesionado del grupo COLD también presentó valores significativamente inferiores respecto al CTRL ($p=0.026$) (**Figura 28A**). A su vez, el grupo CTRL presentó una mayor expresión de mTOR en el músculo lesionado que el resto de los grupos, aunque estas diferencias no fueron significativas (CTRL: 3.726 a.u.; COLD: 1.233 a.u.; HYPO: 2.557 a.u. y COHY: 1.381 a.u.) (**Figura 28A**). En cuanto a la expresión de pSer²⁴⁴⁸mTOR 9 días post-lesión, los grupos CTRL e HYPO mostraron una mayor expresión que los grupos COLD y COHY en ambos músculos GAS analizados, siendo esta diferencia estadísticamente significativa entre los músculos no lesionados de los grupos COLD e HYPO ($p=0.025$) y entre los músculos de los grupos COLD y COHY y el grupo CTRL ($p=0.025$ y $p=0.021$, respectivamente) (**Figura 28C**). Finalmente, se puede apreciar que el músculo no lesionado del grupo COLD presentó una ratio pSer²⁴⁴⁸mTOR/mTOR total significativamente mayor que el grupo CTRL ($p=0.011$), mientras que el GAS lesionado del grupo COHY presentó un cociente pSer²⁴⁴⁸mTOR/mTOR total significativamente mayor que el grupo CTRL ($p=0.050$) (**Figura 28F**).

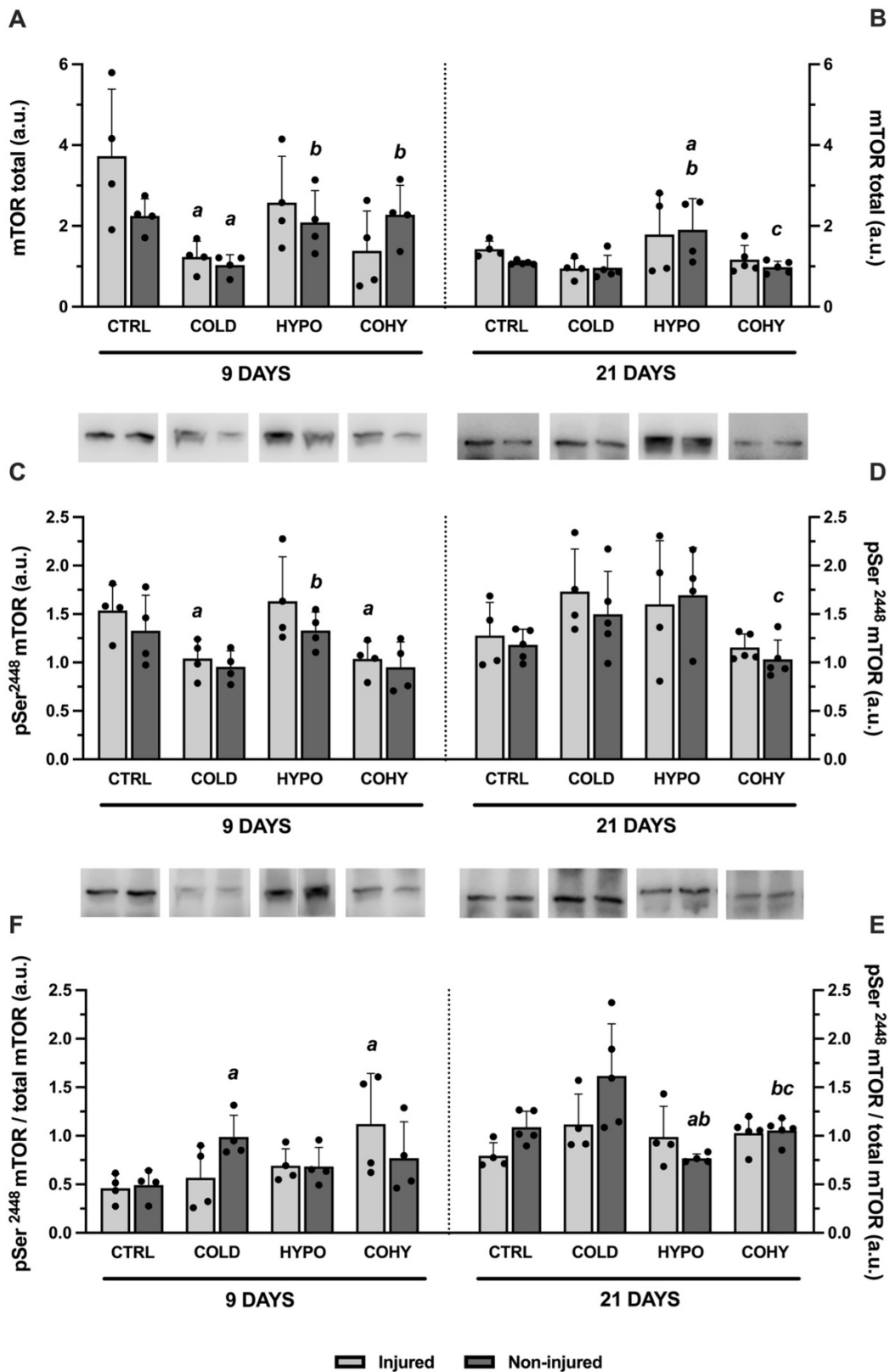


Figura 28: Expresión de las proteínas mTOR y pSer²⁴⁴⁸mTOR en el músculo gastrocnemio lesionado (injured) y no lesionado (non-injured). (A-B) mTOR total, (C-D) pSer²⁴⁴⁸mTOR, (E-F) ratio pSer²⁴⁴⁸mTOR/mTOR total. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como: a, p<0.05 vs. CTRL; b, p<0.05 vs. COLD; c, p<0.05 vs. HYPO entre los músculos de la misma condición. Los puntos representan los valores de cada muestra. Tamaño de la muestra: n=4-5 por grupo a cada punto temporal CTRL, control; COLD, frío intermitente; HYPO, hipoxia intermitente; COHY, frío + hipoxia intermitente.

A los 21 días de intervención, el grupo HYPO mostró un incremento significativo respecto al resto de los grupos en la expresión de la proteína mTOR total en la pata lesionada, mientras que no se detectaron diferencias significativas en la pata no lesionada (**Figura 28B**). En lo que se refiere a pSer²⁴⁴⁸mTOR, los grupos COLD e HYPO mostraron incrementos no significativos debido a la gran dispersión observada en el resto de los grupos, en ambas patas respecto a los grupos CTRL y COHY (entre un 21% y 49%), y un incremento estadísticamente significativo en el músculo no lesionado del grupo HYPO respecto a COHY ($p=0.027$) (**Figura 28D**). Finalmente, se puede observar que el grupo COLD manifestó una mayor ratio pSer²⁴⁴⁸mTOR/mTOR total en el GAS no lesionado que el resto de los grupos experimentales, siendo estos valores estadísticamente significativos en comparación con el grupo HYPO y COHY ($p<0.001$ y $p=0.009$, respectivamente) (**Figura 28E**). Además, el grupo HYPO mostró una ratio pSer²⁴⁴⁸mTOR/mTOR total significativamente menor que los grupos CTRL y COHY en el músculo no lesionado ($p=0.007$ y $p=0.003$) (**Figura 28E**). Así, en la **Figura 28E** se puede ver que la ratio pSer²⁴⁴⁸mTOR/mTOR total no se vio alterada en los músculos lesionados, a pesar de ser sometidos a diferentes estímulos estresantes.

3.3.3. AMPK

La **Figura 29A** muestra como los grupos sometidos a HHI (HYPO y COHY) tendieron a exhibir una expresión de AMPK α inferior a los 9 días, tanto en el músculo lesionado como en el intacto. Así, el grupo HYPO presentó una disminución significativa en el GAS no lesionado respecto a los grupos CTRL y COLD ($p=0.008$ y $p<0.001$, respectivamente), mientras que el grupo COHY lo hizo únicamente respecto al grupo COLD ($p=0.002$) (**Figura 29A**). Por su parte el grupo COLD, manifestó un incremento significativo de la expresión de AMPK α total respecto al grupo CTRL ($p=0.013$) (**Figura 29A**). En cuanto a la forma fosforilada de AMPK (pThr¹⁷²AMPK α), esta aparece sobre-expresada en los dos músculos del grupo HYPO, aunque lo hace de forma más destacada en el músculo lesionado (**Figura 29C**). Pese a los incrementos observados, estas diferencias no son significativas, ya que el grupo HYPO mostró una gran dispersión entre sus muestras, lo que no nos permite obtener resultados más consistentes. La ratio pThr¹⁷²AMPK α /AMPK α total (**Figura 29E**), mantiene la tendencia observada en la forma

fosforilada (**Figura 29C**), de forma que el grupo HYPO exhibió valores considerablemente más elevados que el resto de los grupos, pero estas diferencias no son estadísticamente significativas. Por su parte, el grupo COLD mostró un incremento significativo respecto al grupo CTRL en la pata no lesionada ($p=0.018$) (**Figura 29E**).

Los resultados obtenidos a 21 días en la proteína AMPK α mostraron reducciones significativas de AMPK α en los músculos lesionados de los grupos HYPO y COHY en comparación con el grupo COLD ($p=0.002$ y $p=0.005$, respectivamente), mientras que el grupo COHY también presentó una menor expresión en el músculo no lesionado en relación al grupo CTRL ($p=0.034$) (**Figura 29B**). La **Figura 29D** muestra un incremento significativo de la expresión pThr¹⁷²AMPK α en ambos GAS del grupo HYPO respecto al resto de los grupos, mientras que no se observaron diferencias entre el resto de los grupos experimentales. Por último, en la **Figura 29F** se observa un incremento significativo de la ratio pThr¹⁷²AMPK α /AMPK α total en el músculo lesionado y un incremento no significativo en el músculo no lesionado del grupo HYPO en comparación con los músculos lesionados del resto de los grupos.

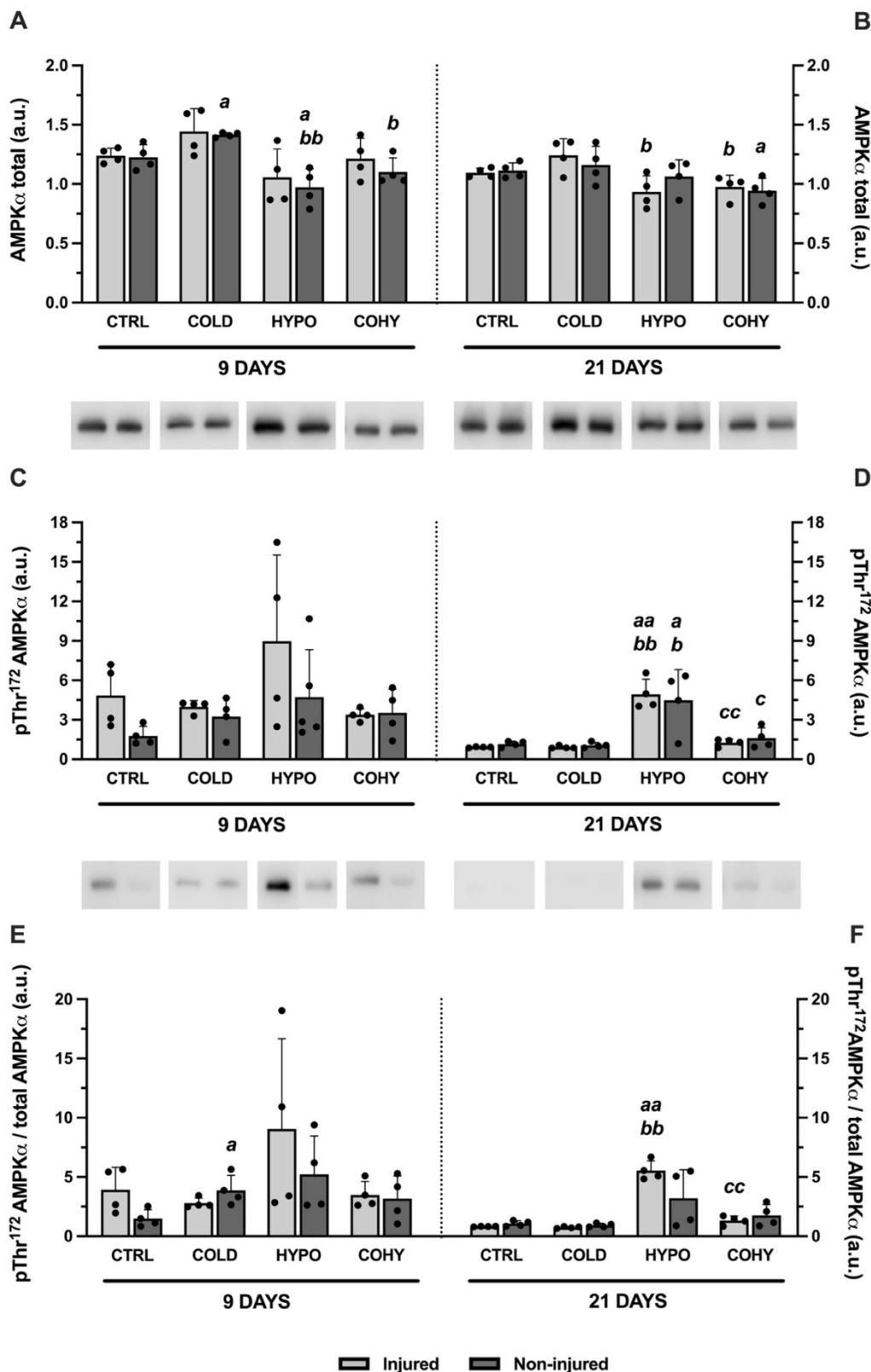


Figura 29: Expresión de las proteínas AMPK α y pThr¹⁷²AMPK α en el músculo gastrocnemio lesionado (injured) y no lesionado (non-injured). (A-B) AMPK α total, (C-D) pThr¹⁷²AMPK α , (E-F) ratio pThr¹⁷²AMPK α /AMPK α total. Las diferencias estadísticamente significativas se indican como: a, $p < 0.05$ vs. CTRL; aa, $p < 0.001$ vs. CTRL; b, $p < 0.05$ vs. COLD; bb, $p < 0.001$ vs. COLD; c, $p < 0.05$ vs. HYPO; cc, $p < 0.001$ vs. HYPO entre los músculos de la misma condición. Los puntos representan los valores de cada muestra. Tamaño de la muestra: $n=4-5$ por grupo a cada punto temporal. CTRL, control; COLD, frío intermitente; HYPO, hipoxia intermitente; COHY, frío + hipoxia intermitente.

Discusión

Bloque 1

1. **Bloque 1: Validación del diseño experimental**

1.1. Simetría anatómica y funcional

El cuerpo y los órganos pueden ser divididos en diferentes partes con relación a sus planos. El plano sagital medio es un plano vertical que sigue el eje de simetría y divide un cuerpo u órgano en dos partes iguales, parte derecha y parte izquierda (Tortora & Derrickson, 2018; Silverthorn, 2019). Desde un punto de vista anatómico, el sistema músculo-esquelético ostenta una simetría anatómica, o partes anatómicas pares, entre su lado derecho y su lado izquierdo. Sin embargo, esta simetría anatómica en los humanos no se manifiesta desde un punto de vista funcional, ya que se muestra una lateralidad o predisposición hacia el uso preferente de una parte o lado del cuerpo respecto al otro (Kertesz *et al.*, 1992). Pese a ello, pocos estudios han focalizado su interés en investigar si realmente esta lateralidad funcional se traduce en diferencias anatómico-fisiológicas entre ambos lados y, sobre todo, si estas diferencias también existen en los animales.

La simetría morfológica de los músculos de ambos lados del cuerpo de los animales utilizados en experimentación ha sido ampliamente aceptada. De hecho, incluso los artículos de referencia en descripción morfo-histológica de los músculos de ratas sólo incluyen en sus estudios el análisis de los músculos de uno de los lados de la línea sagital (Armstrong & Phelps, 1984). Y es que, en la gran mayoría de los estudios únicamente se analizan las diferentes variables de interés en los músculos de un lado del cuerpo, considerando siempre que sus pares musculares presentarán un perfil similar (Panisello *et al.*, 2008; Rizo-Roca *et al.*, 2017a, 2018). Siguiendo en esta misma línea, comúnmente en el ámbito de la investigación se ha utilizado el diseño experimental basado en el modelo de pierna unilateral (Tarnopolsky *et al.*, 2007), es decir, una pierna es utilizada o intervenida (por ejemplo, es sometida a ejercicio, electroestimulación, lesión, isquemia, etc.) mientras que la contralateral es utilizada como control (Masiero *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2014; Contreras-Muñoz *et al.*, 2017, 2021). Este diseño experimental se basa en la presunción de que antes de la intervención ambas piernas o

músculos pares ostentaban patrones morfo-funcionales similares en aquellas variables objeto de estudio (Tarnopolsky *et al.*, 2007).

En humanos, varios estudios han tratado de corroborar la simetría existente entre los músculos de la parte derecha e izquierda del cuerpo. Así, se ha visto que el vasto lateral derecho y el izquierdo no presentan diferencias sistemáticas ni en la proporción de cada tipo de fibras, ni en el área de las fibras (Lexell & Taylor, 1991; Tarnopolsky *et al.*, 2007; Horwath *et al.*, 2021), ni tampoco en el promedio de mionúcleos por fibra (Horwath *et al.*, 2021). Además, tampoco se han identificado diferencias sistemáticas en genes importantes en la regulación del metabolismo y masa muscular como PGC1 α , UCP2, UCP3, Bcl-2 (*B-cell lymphoma2*), VEGF y catalasa, ni en la fuerza entre ambas piernas (Tarnopolsky *et al.*, 2007). Estos estudios se han llevado a cabo tanto en personas jóvenes-adultas (18-40 años) (Lexell & Taylor, 1991; Horwath *et al.*, 2021), como en personas de edad más avanzada (65 años) (Tarnopolsky *et al.*, 2007), demostrándose así, que a pesar de los cambios sufridos en el tejido muscular debido al envejecimiento, la simetría entre ambos lados del cuerpo se mantiene.

En cuanto a las posibles diferencias existentes entre los músculos de ambos lados en los animales, Lexell *et al.* (1994) analizaron las posibles diferencias existentes en el tipo de fibras y en la densidad de fibras entre ambos lados de la línea media corporal en los músculos TA y EDL de conejos, pero no encontraron diferencias significativas entre ambas patas en ninguno de los músculos (Lexell *et al.*, 1994), en línea con lo previamente descrito en humanos. En el año 2000 se publicó un trabajo, también realizado en conejos, en el que se estudiaron la distribución de cada tipo de fibra y su área transversal en los músculos recto femoral, vasto medio y abductor, no descubriendo tampoco diferencias significativas entre los músculos de la pata derecha y los de la pata izquierda (Rab *et al.*, 2000). En ratas, Guo & Zhou (2003) estudiaron las posibles diferencias existentes entre los músculos contralaterales en la concentración y metabolismo de metabolitos implicados en el metabolismo de lípidos (glicerol, ácidos grasos y triglicéridos), en músculos con una composición de fibras mixta como son el cuádriceps, TA y GAS, llegando a la conclusión de que los músculos del lado derecho e izquierdo son

muy similares, y descartando una posible lateralidad metabólica en el tren inferior de las ratas (Guo & Zhou, 2003).

Nuestros resultados corroboran en rata lo previamente descrito tanto en humanos como en conejos a nivel histológico. Así, no se encontraron diferencias significativas ni en el peso de los músculos, ni en el porcentaje de fibras, ni en el FCSA, entre el GAS derecho e izquierdo (**Tabla 3, Figura 13 y 14**). Además, tratando de ir un paso más allá, pudimos corroborar una simetría funcional total entre ambas patas, ya que en ninguno de los parámetros de capacidad contráctil analizados se observaron diferencias sistemáticas entre la pata izquierda y la derecha (**Figura 12**).

Por lo tanto, teniendo todo lo anterior en consideración, podemos concluir que la ausencia de diferencias histo-morfológicas y funcionales entre el GAS derecho e izquierdo de las ratas valida el uso de la metodología de lesión de la pierna unilateral. De forma que, el músculo GAS de un lado de las ratas puede ser intervenido, mientras que el otro puede ser utilizado como control en el estudio de los procesos de regeneración muscular. Además, con estos resultados podemos considerar que es correcto el análisis único de uno de los músculos GAS de cada animal, teniendo la certeza de que el otro tendrá un patrón muy similar a nivel histológico y funcional.

Cabe destacar que este uso indistinto del músculo de uno de los lados no exime de las diferencias existentes entre regiones dentro de un mismo músculo, y las cuales se deben considerar a la hora de analizar los diferentes parámetros de interés. Por último, apuntamos la necesidad de corroborar estos resultados en otros grupos musculares, con el fin de garantizar que esta simetría se cumple en toda la musculatura esquelética de las patas traseras de las ratas.

1.2. Validación del método de lesión

Validar el método de lesión y el sistema de evaluación de la función muscular fue uno de los primeros objetivos planteados al comenzar esta investigación. Nuestro método de lesión se basó en el previamente diseñado y publicado por Contreras-Muñoz *et al.*

(2016), pero consideramos importante validar nosotros mismos que la ejecución de dicho procedimiento era correcta. Para ello, decidimos incluir en el estudio el denominado grupo CTRL_0. Este grupo de animales fue lesionado y 24 horas después sometido a las pruebas de medición de la función muscular *in vivo*. Las pruebas funcionales realizadas justo un día después de la lesión perseguían dos objetivos: en primer lugar, validar el sistema de evaluación de la función muscular y, en segundo lugar, asegurarnos de que la lesión tenía la suficiente magnitud como para generar deficiencias funcionales en el músculo gastrocnemio. Y es que, las pérdidas de función muscular son un signo inequívoco de que una lesión muscular ha tenido lugar y constituyen un óptimo marcador para evaluar la regeneración muscular (Tiidus, 2008).

Efectivamente, las pruebas funcionales llevadas a cabo pudieron corroborar que la lesión inducida quirúrgicamente producía pérdidas en las capacidades contráctiles del músculo. De hecho, todos los parámetros evaluados mostraron reducciones significativas de la función muscular en el músculo lesionado en comparación con el músculo no lesionado (**Figura 15**), demostrando que la lesión quirúrgica imitaba perfectamente, al menos a nivel funcional, una lesión muscular producida por ejercicio (Contreras-Muñoz *et al.*, 2016), y que el protocolo de evaluación elaborado era óptimo para medir diferentes variables importantes en el estudio de la función muscular.

Por último, decidimos realizar unas tinciones de Hematoxilina-Eosina con la finalidad de observar a nivel histológico la magnitud y localización de la lesión muscular (**Figura 16**), y poder así confirmar de que el método de lesión generaba un daño muscular evidente a nivel histológico, y que por lo tanto, se podrían usar marcadores histológicos para evaluar los procesos de regeneración muscular (Tiidus, 2008; Contreras-Muñoz *et al.*, 2016). Gracias a las evidencias histológicas y funcionales pudimos validar el método de lesión y, por consiguiente, el modelo animal que posteriormente ha sido utilizado a lo largo de toda la investigación.

Bloque 2

2. **Bloque 2: Respuestas fisiológicas a la exposición intermitente a frío e hipoxia**

La capacidad de adaptación a ambientes o entornos estresantes es esencial para garantizar la supervivencia y reproducción de los animales (Maekawa *et al.*, 2013). Estas adaptaciones pueden traducirse en cambios estructurales, funcionales o comportamentales (Moore *et al.*, 1998). Uno de los principales objetivos de esta tesis es tratar de comprender las diferentes respuestas fisiológicas derivadas de la exposición a ambientes estresantes como el frío y la hipoxia. Para ello, decidimos centrar nuestro foco de atención en los cambios en la composición corporal de los animales, en las respuestas hematológicas y en las adaptaciones morfológicas del músculo estriado.

2.1. Respuestas en la masa y la composición corporal

La masa corporal ha sido siempre utilizada como un buen marcador del estado de salud de los animales. Las situaciones estresantes pueden comprometer el crecimiento de los animales y activar vías catabólicas, incluso llegando a dañar órganos y tejidos (distrés). Sin embargo, una correcta aclimatación a ambientes estresantes favorecerá reacciones anabólicas y protegerá los tejidos de posibles daños o patologías (eustrés) (Tsibul'nikov *et al.*, 2016).

Los efectos de la exposición crónica al frío han sido previamente descritos en roedores no hibernantes, mostrándose reducciones en la masa corporal de los animales en algunos de los estudios (Suzuki *et al.*, 1997; Mizunoya *et al.*, 2014; Tsibul'nikov *et al.*, 2016) y ausencia de cambios en otros estudios (Deveci *et al.*, 2001b; Egginton *et al.*, 2001; Deveci & Egginton, 2002, 2003; Sepa-Kishi *et al.*, 2017). Sin embargo, la exposición intermitente al frío genera una respuesta diferente, produciendo incrementos en la masa corporal de los roedores (**Figura 17**) (Yoo *et al.*, 2014; Tsibul'nikov *et al.*, 2016). Además, el frío intermitente provoca incrementos del tejido adiposo inguinal y del BAT (**Tabla 4**) y la activación de proteínas como UCP-1 y PGC-1, implicadas en la termogénesis y balance energético (Egginton *et al.*, 2001; Yoo *et al.*, 2014; Ravussin *et al.*, 2014; Tsibul'nikov *et al.*, 2016). Estas respuestas al frío sugieren que la exposición intermitente es capaz de producir cambios aclimatativos, generando un pre-condicionamiento

termogénico ante futuras exposiciones al frío (Yoo *et al.*, 2014; Tsibul'nikov *et al.*, 2016), sin comprometer el metabolismo y función de los tejidos y manteniendo el crecimiento y la masa muscular de los animales (**Tabla 4**) (Yoo *et al.*, 2014; Ravussin *et al.*, 2014; Tsibul'nikov *et al.*, 2016).

La pérdida de masa corporal (tanto por reducciones de masa grasa, como de masa magra), el incremento de la tasa metabólica, la pérdida de agua, la reducción de la ingesta de alimentos (consecuencia de la reducción del apetito), y el incremento del consumo de energía producen la conocida “anorexia de altitud” (Mathieu-Costello, 2001; Debevec *et al.*, 2014; Chaillou and Lanner, 2016; Dünnwald *et al.*, 2019). Los cambios en la composición corporal derivados de la hipoxia dependen de la severidad y de la duración de la exposición, y están condicionados por la intensidad de la actividad física llevada a cabo durante la exposición a la hipoxia. Esta relación directa entre la dosis de hipoxia y sus efectos en la composición corporal ha sido descrita tanto en animales estabulados en ambientes muy controlados (control sobre el frío, la humedad, la ingesta alimenticia y la actividad), como en expediciones a gran altura (Kayser *et al.*, 1993; Hoppeler & Vogt, 2001; Mathieu-Costello, 2001; Cabrera-Aguilera *et al.*, 2018; Dünnwald *et al.*, 2019; Flores *et al.*, 2020). Así, prácticamente se pueden reportar tantas respuestas diferentes como protocolos existentes, que van desde reducciones en la masa corporal de los animales y retrasos en su crecimiento, hasta la ausencia de cambios e incluso incrementos en la masa corporal (Mathieu-Costello, 2001; Siques *et al.*, 2006; Cabrera-Aguilera *et al.*, 2018; Flores *et al.*, 2020). Para poder comparar nuestros resultados con trabajos previos, hemos fijado nuestra atención en trabajos realizados con anterioridad en nuestro laboratorio, ya que estos se basan en protocolos de HHI similares al de la presente investigación. En estos trabajos, en concordancia con nuestros resultados (**Figura 17, Tabla 4**), no se encontraron cambios significativos entre la masa corporal de los animales sometidos a HHI y los animales controles (Panisello *et al.*, 2007, 2008; Rizo-Roca *et al.*, 2017a, 2018), además se preservó, e incluso se aumentó en algunos casos, la masa de los músculos SOL, TA y GAS tras 3-4 semanas de exposición intermitente a la hipoxia (Rizo-Roca *et al.*, 2017a; Cabrera-Aguilera *et al.*, 2018). Sin embargo, en el presente estudio durante los primeros días de HHI (9 días), los animales del grupo HYPO presentaron un incremento de la masa corporal inferior al grupo CTRL

(**Figura 17, Tabla 4**). Previamente habíamos observado que los animales sometidos a HHI no sufrían una reducción en la ingesta alimenticia (Ramos-Romero *et al.*, 2020), y considerando que estos animales aumentaron significativamente la masa magra en este mismo periodo, todo apunta a que las reducciones de la masa corporal observadas durante los primeros días de hipoxia se deben a la disminuciones de la masa grasa (**Figura 17**) (Mathieu-Costello, 2001). En resumen, todo parece indicar que la exposición a la hipoxia hipobárica 4 h al día por debajo de los 5.000 m durante un periodo comprendido de entre 9 y 33 días, no compromete el crecimiento normal de los animales y representa una dosis óptima de hipoxia de cara a preservar la masa muscular. El mantenimiento o incluso aumento de la masa muscular es un buen indicador de salud y de ausencia de procesos catabólicos y, por lo tanto, estos resultados ayudan a confirmar que el uso de la exposición intermitente protege al organismo del catabolismo producido por el estrés (Tsibul'nikov *et al.*, 2016).

Conocer el grado de respuesta de los animales frente al estrés del frío y de la hipoxia aplicados de forma simultánea era uno de nuestros principales intereses, pero sobre todo, nuestro interés recaía en conocer si esta respuesta podría ser mayor a la generada por la exposición a estos dos estímulos por separado. Los valores registrados nos indicaron que el grupo COHY tuvo una ganancia de peso relacionada con el crecimiento menor durante los primeros días intervención, siendo además ésta más pronunciada que la registrada en el grupo HYPO (**Figura 17**). La disminución de peso o ralentización del crecimiento durante los primeros días de intervención puede estar directamente relacionada con el estrés causado por la exposición aguda y repentina a estímulos estresantes (Tsibul'nikov *et al.*, 2016). Sin embargo, con el paso de los días, las diferencias respecto al grupo CTRL desaparecieron, en contra de lo previamente reportado por Templeman *et al.* (2010) pero en concordancia con los resultados previos publicados por Jackson *et al.* (1987), sugiriéndose una posible habituación de los animales al ambiente estresante. Además, esta habituación puede ser corroborada por el incremento significativo de la masa muscular (**Tabla 4**), señal de ausencia de procesos catabólicos fruto del estrés (Tsibul'nikov *et al.*, 2016). El grupo COHY presentó una tendencia similar a la observada en el grupo HYPO en cuanto a ganancias de masa corporal y masa muscular se refiere, pero a su vez, mostró al igual que el grupo COLD

incrementos en el BAT a 21 días (**Tabla 4**), mostrando que el estímulo hipóxico, al menos de forma intermitente, no inhibe la capacidad de termorregulación ni la aclimatación al frío de las ratas, en contra de lo previamente sugerido por Gautier *et al.* (1991).

Una de las no deseadas consecuencias de la exposición a la hipoxia es la hipertensión arterial pulmonar (PAH, *Pulmonary Arterial Hypertension*) (Ma *et al.*, 2015; Mirrakhimov & Strohl, 2016; Brito *et al.*, 2020). La PAH generada por hipoxia se produce debido a la vasoconstricción pulmonar hipóxica generalizada y al consiguiente incremento en la resistencia vascular pulmonar, y va acompañada por un remodelamiento vascular pulmonar (Pak *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2015; Mirrakhimov & Strohl, 2016; Brito *et al.*, 2020). Esta hipertensión pulmonar generalmente acaba derivando en la hipertrofia del ventrículo derecho (Ma *et al.*, 2015; Rizo-Roca *et al.*, 2017a). Tras 9 días de HHI, el grupo HYPO mostró una mayor masa relativa del ventrículo derecho que el resto de los grupos (**Tabla 4**), en concordancia con lo reportado en estudios previos (Rizo-Roca *et al.*, 2017a). Sin embargo, tras 21 días, pese a mostrarse valores ligeramente superiores en el índice ventrículo derecho/masa total del corazón, estos valores no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al resto de los grupos, pudiendo deberse estos cambios a una posible aclimatación a la hipoxia (Panisello *et al.*, 2007). Curiosamente, el grupo COHY no presentó signos de PAH en ninguno de los puntos temporales estudiados. Así, parece que la exposición a estos dos estímulos (frío e hipoxia) de forma simultánea, produce un efecto protector contra la PAH inducida por hipoxia. Gracias a este trabajo hemos podido constatar que este efecto protector que se había observado en exposiciones crónicas a la hipoxia y al frío (Banchemo *et al.*, 1985), también tiene lugar en exposiciones intermitentes (**Tabla 4**). Pese a no contar con más evidencias que nos puedan aclarar el motivo de esta protección ejercida por el frío ante la PAH producida por hipoxia, consideramos que posiblemente la vasoconstricción periférica generalizada inducida por la exposición al frío (Granberg, 1991) pueda causar una mayor resistencia vascular en los vasos periféricos, de forma que la resistencia vascular y el trabajo cardiaco en los circuitos sistémicos y pulmonares se equilibren, evitándose la hipertrofia del ventrículo derecho.

2.2. Respuestas hematológicas

En cuanto a las respuestas hematológicas, hemos podido observar que el frío intermitente incrementó ligeramente los parámetros hematológicos relacionados con el transporte de oxígeno (Htc, RBC y [Hb]), aunque este incremento fue únicamente estadísticamente significativo en el parámetro [Hb] a 9 días (**Figura 18**). Probablemente la ausencia de diferencias significativas en el resto de parámetros pueda deberse a la alta dispersión encontrada en los resultados, sobre todo en las muestras de 9 días. Las exposiciones prolongadas al frío se caracterizan por un incremento en el consumo de oxígeno debido a la alta demanda energética derivada de la termorregulación y del aumento en la producción de calor metabólico. Así, para poder sustentar esta mayor demanda de oxígeno a nivel tisular es necesario incrementar la capacidad de transporte de oxígeno (Deveci *et al.*, 2001b; Maekawa *et al.*, 2013). Nuestros resultados coinciden con los observados tras exposiciones crónicas al frío, donde se han observado incrementos significativos en [Hb], RBC, Htc y MCHC en roedores no hibernadores (Deveci *et al.*, 2001b; Maekawa *et al.*, 2013). Se considera que durante una exposición aguda al frío, el incremento de RBC circulantes puede ser debido a un incremento en la eritropoyesis, sin embargo, con la exposición prolongada es posible que este incremento de RBC sea consecuencia de una reducción de la destrucción de eritrocitos (Deveci *et al.*, 2001b). Por otro lado, nuestros resultados sólo mostraron un incremento significativo del número de WBC a 9 días, mientras que no se observaron cambios en WBC a 21 días, ni en el número de plaquetas en ninguno de los dos puntos temporales (**Tabla 5**). Nuestros resultados, por lo tanto, se contraponen con las reducciones significativas observadas en el número plaquetas y en los WBC observados por Deveci *et al.* (2001b) tras la exposición crónica al frío, pudiendo ser la exposición intermitente la posible causa de estas diferencias.

En el caso de la hipoxia, los incrementos en los parámetros relacionados con el transporte de oxígeno son evidentes y significativamente consistentes (**Figura 18**). Ha sido ampliamente reportado que la altitud *per se* produce incrementos en la capacidad de transporte de oxígeno, tanto en animales como en humanos que viven en altura (Vinegar & Hillyard, 1972; León-Velarde *et al.*, 1993; Heinicke *et al.*, 2003; Zhang *et al.*,

2018). En concordancia con estudios previos, en los que se han utilizado protocolos similares, en nuestro trabajo hemos podido observar que las respuestas hematológicas a la altitud tienen lugar en un corto periodo de tiempo (detectables en nuestro muestreo a 9 días) y se mantienen mientras el estímulo hipóxico está presente (**Figura 18**) (Casas *et al.*, 2000; Esteva *et al.*, 2009; Núñez-Espinosa *et al.*, 2014, 2015). Subrayar que los sujetos expuestos de forma intermitente a la altura pueden alcanzar valores de [Hb], RBC y Htc cercanos a los observados en residentes de alta altitud o en sujetos crónicamente expuestos a la hipoxia (Heinicke *et al.*, 2003). De hecho, una única exposición a la altura durante 90 minutos es suficiente para inducir un incremento significativo en la secreción de EPO en humanos (Rodríguez *et al.*, 2000). Además, en la búsqueda de la dosis óptima de hipoxia que produzca los efectos beneficiosos deseables en el mínimo de tiempo posible, se demostró que 9 sesiones alternas de 90 minutos a 4.000-5.000 m son suficientes para producir la mayor respuesta hematológica posible (Casas *et al.*, 2000). Estos hallazgos previos en humanos coinciden con nuestros resultados, ya que en el presente estudio no se han observado cambios en los parámetros relacionados con el transporte de oxígeno en los diferentes puntos temporales, indicando que una exposición más prolongada a la hipoxia no producirá mayores respuestas hematológicas. La reducción del conteo de plaquetas es evidente durante los primeros días en altura debido a la activación y agregación plaquetaria derivada de situaciones de gran estrés (Lehmann *et al.*, 2006; Vij, 2009; Rocke *et al.*, 2018; Shang *et al.*, 2020), pero esta situación es revertida con el paso de los días (**Tabla 5**). En cuanto a los WBC, hemos podido observar un incremento significativo respecto al grupo CTRL tras 9 días y en comparación con todos los grupos tras 21 días de HHI (**Tabla 5**) (Facco *et al.*, 2005).

Finalmente, destacar la mayor respuesta eritropoyética observada cuando la hipoxia y el frío han sido aplicados de forma simultánea (COHY). De hecho, se han observado incrementos significativos en los valores [Hb], HTC y RBC, y no sólo respecto al grupo CTRL, sino que el grupo COHY también presentó valores más elevados que el grupo COLD e incluso que el grupo HYPO, aunque estos no sean significativos (**Figura 18**). Nuestros resultados se contraponen a los publicados por Lechner *et al.* (1981), en los que advirtieron una reducción en la respuesta eritropoyética tras la exposición a frío e

hipoxia de forma simultánea en comparación con los valores observados tras la exposición a la hipoxia de forma aislada. Estas discrepancias pueden deberse al diferente tipo de hipoxia utilizado en cada uno de los estudios (hipobárica vs. normobárica). Sin embargo, nuestros resultados concuerdan con los reportados por Templeman *et al.* (2010) quienes observaron una respuesta hematológica mayor ante la exposición al frío y a la hipoxia de forma conjunta que la observada tras la exposición a estos dos factores de forma independiente.

2.3. Respuestas morfológicas y de capacidad oxidativa del músculo

A pesar de no contar con la capacidad de dividirse y proliferar, las fibras musculares pueden alterar su tamaño drásticamente (Attwaters & Hughes, 2021). El tamaño de las células musculares es controlado tanto intrínsecamente como a través de señales extracelulares. Los factores de crecimiento, la disponibilidad de nutrientes, las señales mecánicas y el estrés pueden regular tanto de forma positiva como negativa el tamaño de las fibras (Lloyd, 2013). Es por ello que la medición del área transversal de las fibras musculares puede aportarnos información importante acerca de la homeostasis y respuestas del tejido muscular ante diferentes intervenciones.

2.3.1. Respuestas al frío intermitente

Tras la exposición intermitente al frío las fibras musculares tienden a mostrar una ligera disminución del FCSA, imitando así a las fibras sometidas a frío de forma crónica (Suzuki *et al.*, 1997). Esta leve reducción en el FCSA se observa ya en los primeros días de exposición (9 días) y va estrechamente ligada a una reducción del diámetro de Feret (**Figura 19**). Por lo tanto, podríamos decir que las fibras expuestas a ICE tienden a reducir su tamaño y adquieren una forma más redondeada, reduciendo la distancia de difusión del oxígeno y el área de dominio de los capilares y, por consiguiente, facilitando la liberación homogénea de oxígeno a la totalidad de la fibra muscular (Suzuki *et al.*, 1997; Egginton *et al.*, 2001). En cuanto al comportamiento de cada tipo de fibra, cabe destacar que a corto plazo (9 días) parece que son las fibras de carácter oxidativo (SO, FOG y FIG) las que más sufren estos cambios morfológicos, mientras que, a largo plazo, esta

reducción parece depender más del carácter contráctil de las fibras, siendo las fibras tipo II, las que presentan mayores cambios (FOG, FIG, FG) (**Figura 19**).

En cuanto a la capilarización individual de las fibras, el grupo COLD mostró a los 9 días una disminución no significativa del NCF, sin embargo, el índice de capilarización (CCA) no manifestó diferencias respecto al grupo CTRL y, por lo tanto, se puede considerar que la oxigenación de las fibras se mantuvo gracias a la reducción en el tamaño de las fibras durante los primeros días de exposición al frío (**Figura 20**) (Suzuki *et al.*, 1997; Egginton *et al.*, 2001; Deveci & Egginton, 2003). No obstante, tras 21 días de ICE, las ratas manifestaron un ligero aumento en el NCF, que se tradujo, debido a la menor FCSA, en un tímido incremento del CCA, favoreciéndose, por lo tanto, la oxigenación por área de fibra (**Figura 20**) (Suzuki *et al.*, 1997; Deveci & Egginton, 2002). Además, el gastrocnemio expresó una mayor capilarización global del músculo tras 21 días de ICE, como así lo refleja el incremento de la ratio C/F en el grupo COLD (**Figura 21C**). Los incrementos registrados en el grupo COLD, tanto en el cociente C/F como en NCF y CCA, están directamente relacionados con el incremento significativo observado en la expresión de la proteína pro-angiogénica VEGF durante los primeros días de exposición al frío (**Figura 23C**). Estos resultados parecen concordar con la idea de que la angiogénesis es un fenómeno que se instaura de un modo progresivo, de forma que los incrementos en la expresión de VEGF observados tras los primeros 9 días de ICE se manifiestan a nivel histológico más adelante (Deveci & Egginton, 2003). En este caso, los cambios han podido ser detectados en el muestreo realizado tras 21 días de intervención. Los capilares musculares tienen un papel fundamental en el suministro de oxígeno y de nutrientes a las fibras, pero a su vez, la red capilar también tiene un importante rol en la eliminación de desechos metabólicos y en la termorregulación, y de ahí, su gran importancia durante las exposiciones al frío (Deveci & Egginton, 2002).

Se ha observado que durante la aclimatación al frío aumenta el consumo de glucosa por parte del músculo y se sobre-regulan las vías de metabolismo oxidativo, a través de vías independientes de insulina, con la finalidad de mantener la alta demanda metabólica muscular generada durante la termorregulación (Bukowieckh, 1989; Vallerand *et al.*, 1990; Sepa-Kishi *et al.*, 2017). En nuestro caso, este incremento en el

consumo de glucosa puede observarse gracias al ligero incremento observado en la expresión de la proteína transportadora de glucosa GLUT1 (**Figura 23B**).

Considerando los incrementos observados en la expresión de las proteínas VEGF y GLUT1 tras la exposición al frío durante 9 días, parece que la vía de señalización gobernada por HIF-1 α podría estar sobre-regulada a nivel muscular ante el frío intermitente (**Figura 23**).

2.3.2. Respuestas a la hipoxia intermitente

En el presente estudio hemos podido observar que la HHI, aplicada de forma aislada, produce una tendencia a reducir el FCSA de los tipos de fibras SO y FG tras 9 días de exposición. Además, esta reducción viene acompañada por un menor diámetro de Feret de las fibras, con el fin de facilitar una liberación de oxígeno de forma homogénea y reducir las distancias de difusión a lo ancho de la fibra muscular (**Figura 19**). No obstante, tras 21 días de exposición a hipoxia intermitente, hemos podido ver que son las fibras de carácter oxidativo (SO, FOG y FIG) las que presentan una mayor respuesta a la hipoxia, reduciendo de forma notable su FCSA y su diámetro de Feret, mientras que las fibras de carácter glucolítico no presentan diferencias respecto al grupo CTRL (**Figura 19**).

Las fibras de los animales del grupo HYPO son las que menor NCF presentan (**Figura 20**). Teniendo en cuenta que el NCF y el FCSA de las fibras están estrechamente relacionados, se entiende que cuanto más pequeñas sean las fibras menor será el NCF que presenten. Tras 21 días de hipoxia, las fibras SO y FOG mostraron un mayor CCA como consecuencia de la reducción de su FCSA (**Figura 20A y B**). Estos cambios en la morfología de las fibras SO y FOG, indican que las fibras con mayor carácter oxidativo son las que en mayor medida responden al estímulo hipóxico, reduciendo tanto la distancia de difusión, como el área de dominio de los capilares. La gran mayoría de estudios coinciden en el hecho de que la hipoxia *per se*, no es capaz de estimular la angiogénesis en el músculo esquelético, siendo necesaria la presencia de un estímulo adicional como la actividad física para inducir el proceso angiogénico (Jackson *et al.*,

1987; Deveci *et al.*, 2001a; Deveci & Egginton, 2002; Rizo-Roca *et al.*, 2018). En esta línea, Deveci *et al.* (2001a) llevaron a cabo algunos experimentos con el fin de entender la importancia de la actividad mecánica del músculo durante la exposición pasiva a la hipoxia y la importancia del tiempo de exposición a la hipoxia. Así, observaron que tras 3 semanas de hipoxia crónica, sólo los músculos activos, como el diafragma (músculo respiratorio) y el SOL (músculo postural), incrementaron su capilarización, mientras que los músculos locomotores como el EDL y el TA no mostraron cambios en la ratio C/F; curiosamente en este estudio no se observaron cambios en el FCSA (Deveci *et al.*, 2001a). Sin embargo, el mismo estudio fue llevado a cabo durante un periodo de tiempo más largo (6 semanas), así pudieron ver cómo la capilarización de las fibras aumentó en los cuatro músculos estudiados (EDL, TA, diafragma y SOL), sin observar cambios en la FCSA (Deveci *et al.*, 2002). Estos dos estudios demuestran que tanto la actividad contráctil del músculo como el tiempo de exposición (dosis de hipoxia) son factores importantes para la estimulación de la angiogénesis. Nuestros resultados confirman que la HHI en reposo durante un periodo corto (como 21 días) no produce una respuesta angiogénica considerable en el músculo, seguramente debido a la ausencia de un estímulo mecánico y metabólico importante (Deveci *et al.*, 2001a, 2002; Rizo-Roca *et al.*, 2018).

En cuanto a la vía de señalización de HIF-1 α estudiada en el presente trabajo, hemos podido ver que la hipoxia intermitente manifiesta una tendencia a aumentar la expresión de la proteína VEGF tras 9 días (**Figura 23C**). Aun así, a pesar de los mayores valores de VEGF registrados, este incremento no se ha visto reflejado a nivel histológico, ya que ni la ratio C/F ni el NCF ha sufrido incrementos en ninguno de los puntos temporales estudiados y, por lo tanto, podemos concluir que no ha habido formación de nuevos capilares (**Figura 21 y 23**). A pesar de ello, no hay que olvidar que la red capilar es el resultado de la combinación de procesos simultáneos y continuos de angiogénesis, remodelación y eliminación de capilares en respuesta a diferentes estímulos hemodinámicos y metabólicos (Pries & Secomb, 2014), y que VEGF, más allá de intervenir en la formación de nuevos capilares, también tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la red capilar, incluso ante situaciones como la pérdida de masa muscular (Breen *et al.*, 2008). Los resultados de HIF-1 α y de GLUT1 ponen en duda la

sobre-regulación de la vía de señalización de HIF- α tras la exposición a HHI (**Figura 21A y B**). VEGF, por su parte, puede ser regulado por la vía de señalización HIF-1 α en situaciones de una baja tensión de oxígeno, pero también puede ser regulado por citoquinas inflamatorias, incrementos en el estrés oxidativo o por AMPK (Breen *et al.*, 2008).

Cabe destacar, que las alteraciones sistémicas y locales llevadas a cabo durante la aclimatación a la hipoxia pueden atenuar el grado de hipoxia percibido a nivel celular en algunos tejidos (Lundby *et al.*, 2009). Por lo tanto, los ajustes sanguíneos y morfológicos observados en nuestro estudio puede que atenúen parcialmente el grado de hipoxia a nivel muscular. Además, la ausencia de actividad por parte del músculo, junto con la alta tolerancia del músculo a la hipoxia y a la acidosis metabólica, nos hacen pensar que el estímulo hipóxico producido por nuestro protocolo puede resultar insuficiente como para inducir cambios en la angiogénesis (Ortiz-Prado *et al.*, 2019).

2.3.3. Exposición simultánea al frío y la hipoxia

El grupo COHY, al igual que los otros grupos experimentales, también presentó cambios morfológicos a nivel muscular con el fin de responder ante los estímulos ambientales. Durante los primeros 9 días de intervención este grupo presentó una ligera disminución en el FCSA de todos los tipos de fibras, siendo ésta, al igual que en el grupo HYPO, más marcada en las fibras SO y FG (**Figura 19A-D**). Sin embargo, en el análisis realizado a los 21 días, hemos podido observar como las fibras SO, FOG y FIG presentaron destacadas reducciones no significativas en el FCSA, mientras que las fibras FG no sufrieron ningún cambio (**Figura 19A-D**). Estos resultados confirman que las fibras con mayor carácter oxidativo son las que mayor respuesta presentan ante la HHI e ICE, reafirmando el diferente comportamiento que tienen los distintos tipos de fibras ante diferentes estímulos (Banchemo *et al.*, 1985; Deveci *et al.*, 2002; Panisello *et al.*, 2007; Rizo-Roca *et al.*, 2017a, 2018). Además, nos gustaría destacar que las fibras del grupo COHY sufrieron mayores reducciones en el FCSA que las fibras de los grupos HYPO y COLD, lo cual parece indicar que ambos estímulos aplicados de forma simultánea generan una respuesta morfológica mayor. En este caso también, la reducción del FCSA

en los diferentes tipos de fibras estuvo acompañada por una reducción del diámetro de Feret de las fibras (**Figura 19E-H**).

El NCF presentó valores inferiores tras la exposición al frío y a la hipoxia de forma conjunta durante los primeros 9 días, sin embargo, el CCA se mantuvo gracias a la disminución del área de las fibras, de forma que la irrigación de las fibras fue conservada (**Figura 20**). Sin embargo, a 21 días, el grupo COHY no presentó apenas cambios en el NCF respecto al grupo CTRL, pero sí que incrementó el CCA en las fibras oxidativas (SO, FOG y FIG), debido a una reducción del área de las fibras, mejorando así el aporte de oxígeno por área de fibra. En cuanto a la capilarización global del músculo, previamente Banchemo *et al.* (1985) habían observado incrementos significativos en la capilarización muscular tras la exposición crónica al frío y la hipoxia de forma simultánea. Contrariamente, en nuestro modelo basado en una exposición intermitente no hemos podido constatar incrementos ni en la CD ni el cociente C/F en ninguno de los puntos temporales estudiados (**Figura 21**).

Los parámetros moleculares estudiados indican que el frío y la hipoxia concurrentes no inducen la activación de la vía de señalización de HIF-1 α , observándose de hecho reducciones significativas respecto al grupo COLD a 9 días en HIF-1 α y en sus proteínas diana GLUT1 y VEGF. La ausencia de activación de la vía HIF-1 α puede deberse, al igual que lo hemos visto en el grupo HYPO, a diferentes alteraciones sistémicas, como el incremento en el transporte de oxígeno (RBC y [Hb]), y a cambios locales, como las reducciones en las distancias de difusión a nivel muscular, que atenúan el efecto de la hipoxia a nivel celular.

2.3.4. Cambios en los tipos de fibras tras la hipoxia y el frío intermitente

El porcentaje de cada tipo de fibra presente en el músculo nos dará información importante acerca de su capacidad contráctil y metabólica. En el muestreo realizado tras 9 días de tratamientos pudimos observar un incremento en el tipo de fibras FOG en los grupos experimentales COLD e HYPO. En el caso del grupo HYPO, el incremento de las fibras FOG tuvo lugar a expensas de una reducción en el tipo de fibras FIG. Las fibras FIG

tienen un metabolismo mixto (glucolítico-oxidativo), y por lo tanto, presentan una alta plasticidad, lo cual les permite transformarse en fibras FOG o FG en función de las demandas metabólicas (**Figura 22**) (Rizo-Roca *et al.*, 2018). Sin embargo, el incremento en la proporción de fibras FOG del grupo COLD estuvo directamente relacionado con una disminución en el tipo de fibras SO. Tras 21 días de exposición a ambientes estresantes únicamente el grupo HYPO presentó cambios, mostrando una reducción del porcentaje de fibras SO. El músculo experimenta durante el crecimiento transformaciones naturales de las fibras, desde un fenotipo FOG a uno SO (Ishihara *et al.*, 2000). Esta transformación queda inhibida a consecuencia de la exposición a la hipoxia dando lugar a incrementos en los porcentajes de fibras FOG (Ishihara *et al.*, 2000). Por otro lado, hemos podido observar que los animales de los grupos HYPO y COHY presentaron mayores valores (incrementos del 22% y 17% vs. CTRL, respectivamente), aunque no significativos, en el tipo de fibras FG. Esto demuestra que el músculo es capaz de adaptarse en busca de formas más eficientes para producir energía en situaciones de baja disponibilidad de oxígeno (**Figura 22**) (Jackson *et al.*, 1987).

2.4. Resumen *Bloque 2*

Tras reparar en algunos de los cambios de composición corporal, hematológicos y musculares producidos por la exposición al frío, a la hipoxia, y al frío y la hipoxia de forma simultánea, podemos extraer diferentes conclusiones acerca de las respuestas fisiológicas de los animales ante estos estímulos estresantes.

La exposición intermitente al frío produce respuestas adaptativas en los animales con la finalidad de mejorar la termogénesis, tanto a corto como a largo plazo. Se ha observado que para mejorar la NST los animales incrementan la masa de BAT. Además, para sustentar el incremento del consumo de oxígeno derivado de la termogénesis, los animales incrementan ligeramente el transporte de oxígeno a nivel hematológico y su liberación a nivel muscular por medio de la mejora en la capilarización muscular.

La exposición intermitente a la hipoxia no afecta al crecimiento de los animales y previene la pérdida de masa muscular vinculada con la exposición a ambientes hipóxicos. Sin embargo, la intermitencia del estímulo no es capaz de evitar afecciones como la PAH, especialmente durante la fase aguda de aclimatación. La hipoxia intermitente pasiva incrementa de forma destacada el transporte de oxígeno sanguíneo, con el objetivo de mantener el aporte de oxígeno a los tejidos, y produce adaptaciones morfológicas musculares, con la finalidad de mejorar la liberación de oxígeno a nivel fibrilar, pero sin producir angiogénesis.

La exposición al frío y a la hipoxia concurrente no parece comprometer la capacidad de termorregulación de los animales homeotermos, mostrándose una óptima capacidad de aclimatación al frío de las ratas (incremento de BAT) en ambientes hipóxicos. Además, la aplicación conjunta de estos dos estímulos estresantes produce un efecto cardioprotector frente al PAH producido por la hipoxia. El frío y la hipoxia juntos incrementan la respuesta eritropoyética de los animales, en comparación con lo observado tras la exposición a estos dos estímulos por separado. Finalmente, a nivel muscular, se observa una mayor respuesta adaptativa de las fibras (que la observada tras la aplicación de la hipoxia de forma aislada) encaminada a mejorar su irrigación, pero sin inducir una respuesta angiogénica.

Finalmente, podemos concluir que la exposición intermitente, tanto al frío como a la hipoxia, produce un estímulo suficiente como para provocar respuestas de aclimatación en los animales, pero preservando el crecimiento normal y la masa muscular de estos, reflejo de la ausencia de una respuesta catabólica no deseada.

Bloque 3

3. Bloque 3: El frío y la hipoxia y su efecto sobre la regeneración del tejido muscular

Este tercer bloque tiene como objetivo identificar los diferentes efectos de los tratamientos: 1) frío, 2) hipoxia y 3) frío e hipoxia, sobre la recuperación de la lesión muscular. Los dos puntos temporales escogidos (9 y 21 días) pertenecen a fases avanzadas del proceso de regeneración muscular, es decir, a la fase de remodelación y de maduración, en las cuales ya podemos observar el éxito de las fases precedentes y podemos vaticinar el devenir de la lesión y la posible arquitectura final de la zona lesionada.

Mediante este estudio se pretende mostrar el resultado del proceso de regeneración muscular de forma integral, es decir, desde una perspectiva funcional, histológica y molecular. Desde un punto de vista funcional se busca comprobar el grado de éxito en la recuperación de las propiedades contráctiles del músculo lesionado. Desde una perspectiva histológica, nuestro objetivo es poder comprender si nuestros tratamientos aceleran el proceso de regeneración muscular y si mejoran la arquitectura final del tejido lesionado. Por último, desde una perspectiva molecular, nuestro objetivo es poder identificar si estos tratamientos regulan alguna vía metabólica que pueda estar involucrada en la regeneración muscular.

3.1. Evaluación de la función muscular

La pérdida de la función es uno de los principales signos de una lesión muscular (Warren *et al.*, 1999; Tiidus, 2008; Tidball, 2011), y en contraposición, la restauración de la funcionalidad suele ser considerado como un indicador de recuperación y vuelta a la actividad previa a la lesión. Las alteraciones en el proceso de acoplamiento excitación-contracción pueden llegar a producir reducciones de entre el 57-75% de la fuerza tetánica durante los primeros 5 días post-lesión (Ingalls *et al.*, 1998). Además, se ha demostrado que tras el daño muscular el músculo esquelético presenta mayores deficiencias en la capacidad de generar fuerza a bajas frecuencias (alrededor de los 20 Hz) que a altas frecuencias (más de 50 Hz). De hecho, se considera que la fatiga a baja frecuencia (LFF) tiene origen en la reducción de la activación contráctil o en el fallo

periférico en el acoplamiento entre excitación y contracción, y es por ello que este parámetro se considera de gran utilidad a la hora de evaluar las lesiones musculares y los procesos de regeneración (Tiidus, 2008).

Con el fin de evaluar la capacidad contráctil de los músculos lesionados, tras los periodos y tratamientos de recuperación establecidos, los animales fueron sometidos a una prueba de función muscular *in vivo* mediante la cual se midieron diferentes parámetros como la fuerza pico, la fuerza tetánica, la fatiga a baja frecuencia, el HRT y el CT.

Los déficits en la función muscular aparecen en las primeras horas post-lesión (1-12 h) (Tiidus, 2008) y se mantienen a lo largo del proceso de regeneración muscular, llegándose a observar todavía deficiencias significativas en la funcionalidad de un músculo lesionado al menos 10-14 días después de la lesión (Pereira *et al.*, 2014; Contreras-Muñoz *et al.*, 2016, 2017, 2021) e incluso tras 21 días (Head *et al.*, 2014). Así, nuestros resultados concuerdan con estos hallazgos previos, ya que en nuestro estudio hemos observado que los animales no intervenidos (CTRL) presentaban alteraciones significativas en los principales parámetros de fuerza tanto 9 como 21 días después de sufrir la lesión (**Figura 24**).

Sin embargo, los animales tratados con alguno de los tres protocolos no siguieron la misma evolución que el grupo CTRL en el proceso de recuperación de la funcionalidad muscular post-lesión. Los animales expuestos a frío de forma intermitente mostraron deficiencias significativas en la capacidad contráctil de sus patas lesionadas en todos los parámetros estudiados tras 9 días de tratamiento (**Figura 24A, C y E**), no obstante, mostraron una recuperación de la función del músculo lesionado 21 días post-lesión (**Figura 24B, D y F**). Por su parte, aquellos animales sometidos exclusivamente a HHI (HYPO), mostraron una completa recuperación de la función muscular en todos los parámetros valorados tras 9 días de tratamiento (**Figura 24A, C y E**), corroborándose estos buenos resultados en las pruebas realizadas 21 días post-lesión (**Figura 24B, D y F**). Ante la combinación de frío e hipoxia como tratamiento (COHY), los resultados nos indican la inexistencia de un efecto aditivo fruto de la aplicación de estos dos estímulos

de forma simultánea. De hecho, podemos observar como el grupo COHY mostró un comportamiento similar al que presentó el grupo expuesto únicamente a frío (COLD), registrándose carencias en la funcionalidad de los músculos lesionados tras 9 días, mientras que a los 21 días de tratamiento no se hallaron diferencias funcionales entre los gastrocnemios lesionados y no lesionados. De forma que se puede afirmar la existencia de una recuperación completa de la capacidad contráctil de los músculos lesionados tras 21 días de frío + hipoxia intermitente.

Con motivo del análisis de la recuperación de la función muscular tras la lesión, hemos podido identificar también los efectos que los diferentes tratamientos tienen sobre la fuerza en los músculos no lesionados. Los resultados obtenidos en la presente investigación nos indican que ninguno de los tres tratamientos (frío, hipoxia o frío + hipoxia) produjo cambios consistentes en la función del músculo GAS no lesionado. En estudios previos realizados con ratas expuestas a hipoxia hipobárica crónica pudieron observar que el músculo SOL no sufrió alteraciones en su fuerza pico, incrementó la frecuencia tetánica, redujo el CT y HRT, y no experimentó cambios en la fatigabilidad del músculo tras 10 semanas a 4.000 m de altitud. Este estudio también mostró que el músculo EDL sometido a hipoxia redujo su fuerza pico y frecuencia tetánica, incrementó su resistencia a la fatiga y no presentó cambios en los parámetros HRT y CT en comparación con el grupo normóxico (Itoh *et al.*, 1990). Cabe destacar también que Itoh *et al.* (1990) observaron cambios significativos en la proporción de los diferentes tipos de fibras (reducción de la proporción de fibras FG e incremento de las fibras FOG en el músculo EDL, y reducción de las fibras SO e incremento de las fibras FOG en el músculo SOL). Además, también observaron una reducción significativa del FCSA de las fibras del EDL. Es decir, los cambios que habían reportado en la función muscular podrían deberse a la conversión de fibras y a la reducción del FCSA derivados de la hipoxia (Itoh *et al.*, 1990). Otros estudios más recientes, realizados con ratas adultas expuestas durante 6 semanas a hipoxia hipobárica, observaron en pruebas *in vitro* aumentos significativos de la fuerza específica y de la fatiga en el SOL y en el EDL, es decir, tanto en músculos de contracción lenta como en músculos de contracción rápida, achacando estas variaciones a los cambios en los tipos de fibras aunque sin demostrarlo empíricamente (El-Khoury *et al.*, 2012). Previamente, en un estudio de similares características (ratas Sprague-

Dawley, 6 semanas a 5.000 m), Shiota *et al.* (2004) observaron variaciones en la curva de fuerza-frecuencia, en la que el grupo hipóxico mostró menor fuerza a altas frecuencias, mientras que no observaron cambios consistentes en parámetros como la fuerza pico, HRT, CT o fatiga ni en el músculo sóleo ni en el EDL (Shiota *et al.*, 2004). Por último, Faucher *et al.* (2005) sometieron a las ratas a un mes de hipoxia normobárica (altitud simulada de 5.000 m) y pudieron determinar mediante mediciones *in vitro* que el SOL incrementó la fuerza tetánica gracias a un aumento del porcentaje de fibras tipo II, mientras que el EDL presentó una reducción de la fuerza tetánica y una menor resistencia a la fatiga, sin cambios en la proporción de fibras tipo I y tipo II.

En resumen, en la bibliografía encontrada se observa que ante exposiciones a la hipoxia los músculos responden con comportamientos muy dispares en cuanto a sus capacidades contráctiles se refiere. Estas diferencias en los resultados pueden ser debidas al tipo de hipoxia, al tipo de medición realizada (*in vivo* o *ex vivo*), y al tipo de músculo estudiado (EDL, SOL, etc.). Además, los cambios reportados vienen en su mayoría acompañados por alteraciones en los tipos de fibras y en el área de su sección transversal, enfatizando la importancia que tienen las características morfológicas de las fibras en la funcionalidad del músculo. En nuestro caso, tanto el músculo analizado como el tipo de hipoxia (HHI) son diferentes a los previamente utilizados por otros grupos y, por lo tanto, es difícil poder comparar los resultados. Además, nos hemos encontrado con ausencia de trabajos basados en intervenciones de frío y de frío + hipoxia y en su efecto sobre la función muscular.

Tras corroborar los efectos de los diferentes tratamientos sobre la recuperación de la función muscular post-lesión y en la funcionalidad del músculo no lesionado, nos asaltó la incertidumbre acerca de la forma en la que los tratamientos podrían haber producido variaciones en la morfología de las fibras de nuestro músculo objeto de estudio, el gastrocnemio. Y es que, el músculo esquelético presenta una gran plasticidad, de forma que es capaz de modificar su composición y sus capacidades metabólicas ante requerimientos fisiológicos o situaciones de estrés. Estas adaptaciones se ven reflejadas en cambios en el tamaño de las fibras, en la distribución y porcentaje de los diferentes tipos fibras, en la velocidad de contracción, en la producción de fuerza, en la resistencia

a la fatiga, etc. El área transversal de las fibras y el régimen de contracción de las fibras musculares determinan la capacidad de generar fuerza por parte de un músculo (Huard *et al.*, 2002) y, por lo tanto, posibles cambios en la morfología y tipología de las fibras musculares pueden cambiar la funcionalidad de un músculo. Es por ello que, para comprobar que los cambios encontrados a nivel funcional se debían a la lesión y al consiguiente proceso de regeneración muscular y no a cambios en el tejido muscular no lesionado y que las ausencias de cambios observadas en los músculos no lesionados se correlacionan con una ausencia de cambios en la morfología del músculo, decidimos analizar y observar posibles cambios en las fibras musculares en función de su velocidad contráctil.

Los resultados obtenidos nos indican que la mejora en la funcionalidad muscular observada en los músculos lesionados de los grupos intervenidos no viene derivada de un incremento del FCSA de las fibras (lo cual supondría un incremento en la generación de fuerza muscular), ya que todos los grupos intervenidos o redujeron o no presentaron alteraciones en su FCSA en comparación con el grupo CTRL (**Figura 25C y D**). Además, ningún grupo presentó mayores porcentajes de fibras de gran tamaño (**Figura 25E-H**). Por otro lado, no se ha observado un claro cambio en el perfil contráctil de las fibras musculares (**Figura 25A y B**), lo que hubiera podido suponer mejoras en aspectos como la velocidad contráctil o la resistencia a la fatiga de los músculos.

Por tanto, todo parece indicar que los cambios en la funcionalidad muscular observados en los músculos lesionados vienen derivados por un incremento en el número de unidades motoras disponibles para ser reclutadas durante la contracción, es decir, por una mejora en el proceso de regeneración muscular y no por cambios morfológicos en las fibras musculares pre-existentes. Además, la ausencia de cambios en los porcentajes de cada tipo de fibras y en el área de las fibras se correlacionan directamente con la ausencia de cambios en la funcionalidad de los músculos no lesionados entre los diferentes grupos. Esta ausencia de cambios en la morfología y en la tipología de fibras cobra un especial interés a la hora de pensar en la aplicación de tratamientos similares a los utilizados en nuestro estudio a deportistas. Y es que, más allá de la mejora en la recuperación de la lesión muscular, la ausencia de cambios

destacables en la morfología de las fibras es importante a la hora de considerar la viabilidad y adecuación de un tratamiento para un deportista, ya que una alteración en la composición o incluso en la morfología de las fibras musculares podría afectar al rendimiento deportivo e incluso al perfil competitivo de un atleta.

3.2. Evolución histológica de la lesión

La medicina regenerativa se encuentra en una búsqueda constante de terapias y métodos que permitan acelerar al máximo el proceso de regeneración muscular, pero siempre sin olvidar el principal objetivo de todo proceso de regeneración: la consecución de un tejido histológica y funcionalmente lo más similar posible al tejido previo a la lesión. La consecución de este objetivo ayudaría a reducir al máximo la tasa de *re-injury* y aseguraría el éxito del proceso regenerativo. Es por ello, que una vez evaluada la función muscular, decidimos centrar nuestra atención en marcadores de regeneración muscular y fibrosis, con el fin de verificar el efecto de los tratamientos sobre la regeneración y restauración de la arquitectura muscular. Para ello, decidimos centrar nuestra atención en los marcadores dMHC y colágeno I (**Figura 26**).

3.2.1. Miosina del desarrollo (dMHC)

Tras dejar atrás la fase inflamatoria post-lesión y una vez sumergidos en la fase de regeneración, tiene lugar la activación, proliferación, diferenciación y fusión de las células satélite, dando lugar a la formación de nuevas fibras. Durante la primera semana post-lesión tiene lugar la creación de las primeras fibras en la zona lesionada, estas expresarán la isoforma de la miosina de desarrollo hasta su maduración total, momento en el cual la miosina de desarrollo será permutada por miosina adulta; primero por miosina rápida (MHC-II) y finalmente por miosina lenta (MHC-I) (Chargé & Rudnicki, 2004; Ciciliot & Schiaffino, 2010; Shibaguchi *et al.*, 2019; Forcina *et al.*, 2020). La miosina de desarrollo (miosina neonatal + miosina embrionaria) se expresa durante el desarrollo muscular y puede ser re-expresada de forma transitoria durante el proceso de regeneración muscular (Whalen *et al.*, 1990; Schiaffino *et al.*, 2015; Shibaguchi *et al.*, 2019). Las fibras de nueva formación pueden empezar a expresar miosina de desarrollo

(dMHC, *Developmental Myosin Heavy Chain*) hacia los primeros 2-3 días post-lesión, y esta todavía puede ser detectable 2-3 semanas después de producirse la lesión muscular. Es por ello que es considerada un buen indicador de regeneración muscular (Ciciliot & Schiaffino, 2010; Contreras-Muñoz *et al.*, 2016; Forcina *et al.*, 2020).

Aproximadamente a partir de los 10 días de sufrir una lesión la arquitectura general del músculo suele estar restaurada y las fibras ya empiezan a expresar isoformas MHC tipo II, pero todavía muchas de estas fibras presentarán núcleos centrales como reflejo del proceso de maduración y crecimiento en el que se encuentran. Las fibras irán progresivamente incrementando su FCSA y madurando, de forma que se dará una reubicación periférica de los núcleos centrales. Así, el posicionamiento de los mionúcleos nos permite diferenciar entre las fibras de nueva formación o que se encuentran en fase de crecimiento y las fibras maduras, siendo por lo tanto un buen marcador del proceso de regeneración muscular (Chargé and Rudnicki, 2004; Ciciliot and Schiaffino, 2010; Forcina *et al.*, 2020).

La realidad histológica observada en el grupo CTRL coincide con la información aportada por la bibliografía. Los músculos lesionados correspondientes al grupo CTRL mostraron un porcentaje elevado (alrededor de un 50%) de fibras positivas en dMHC en la zona lesionada 9 días después de producirse la lesión (**Figura 26B**). Sin embargo, hacia la tercera semana (21 días), aunque todavía visible, la presencia de dMHC es prácticamente residual, representando las fibras positivas en dMHC únicamente el 15% del total de las fibras (**Figura 26B**) (Ciciliot & Schiaffino, 2010; Contreras-Muñoz *et al.*, 2016, 2017; Forcina *et al.*, 2020). El FCSA de las fibras en proceso de desarrollo alcanzó un valor medio de 200 μm^2 a los 9 días, mientras que, a los 21 días el área de las fibras rondaba los 50 μm^2 , llevándonos a pensar que las pocas fibras positivas en dMHC que se observaron a los 21 días pudieran ser fibras de formación más tardía (**Figura 26C**). Nuestros resultados, junto con los estudios previos, apuntan a que hacía el día 21 de recuperación la lesión muscular debería encontrarse cerca de un estado de recuperación histológico completo.

Con relación a los efectos de los tratamientos aplicados, todo parece indicar que todos ellos aceleraron la recuperación del tejido lesionado tras 9 días, ya que todos los grupos de intervención presentaron reducciones en la expresión de fibras positivas en dMHC y de fibras con núcleos centrales respecto al grupo CTRL, aunque fue el grupo HYPO el único que presentó diferencias estadísticamente significativas (**Figura 26B-D**). Sin embargo, a los 21 días post-lesión todos los grupos presentaron un perfil muy similar, concordando con la idea de que en este punto temporal la recuperación debería de estar cerca de completarse (**Figura 26B-D**) (Ciciliot & Schiaffino, 2010; Contreras-Muñoz *et al.*, 2016, 2017; Forcina *et al.*, 2020). En cuanto al tamaño de las fibras positivas en dMHC, destacar que 9 días post-lesión únicamente el grupo HYPO presentó fibras de menor tamaño que el grupo no tratado (CTRL), no observándose diferencias en el tamaño de las fibras entre los grupos CTRL, COLD y COHY (**Figura 26C**). Una vez más, tras 21 días los grupos experimentales no presentaron diferencias entre ellos (**Figura 26C**). Curiosamente, el grupo HYPO presentó tras 9 días de tratamiento valores muy similares a los resultados encontrados a 21 días en el grupo CTRL en la expresión de dMHC, en el FCSA de las fibras positivas en dMHC y en el porcentaje de fibras con núcleos centrales (**Figura 26B-D**). De forma que el estado histológico que presentó el grupo HYPO a 9 días es el que cabría esperar observar a 21 días tras una recuperación pasiva.

Pese a no contar con suficientes trabajos previos con los que poder contrastar nuestros resultados, el grupo de Thomas Chaillou reportó que la hipoxia hipobárica crónica (a 5.500 m) no produce cambios en el porcentaje de fibras que presentan una isoforma inmadura de la miosina (miosina embrionaria + neonatal) en el músculo sóleo 7 días después de sufrir una lesión (Chaillou *et al.*, 2014). La discrepancia de los resultados de este trabajo respecto a los nuestros puede ser debida a la dosis y régimen de hipoxia utilizados, es decir, nuestro trabajo basó su tratamiento en una exposición intermitente, mientras que el de Chaillou *et al.* (2014) lo hizo basado en una hipoxia crónica. Así, es posible que la aplicación intermitente de la hipoxia hipobárica evite el retraso en el proceso de regeneración muscular observado en las primeras fases cuando la hipoxia es aplicada de forma crónica (Chaillou *et al.*, 2014). Además, las investigaciones fueron realizadas en músculos diferentes, lo que hace que existan diferencias en la población de fibras y, por consiguiente, en el número de células satélite

asociadas a ellas, y que por lo tanto los efectos de la hipoxia sobre el proceso miogénico puedan ser diferentes.

Trabajos previos no han visto alterado el proceso de regeneración muscular tras la aplicación de frío local post-lesión, ya que no observaron cambios en la proliferación y diferenciación de células satélite, ni en la expresión de desmina y MyoD. Además, la expresión de miosina embrionaria y neonatal, el área de lesión y el porcentaje núcleos centrales no mostraron variaciones tras la aplicación de frío (Shibaguchi *et al.*, 2016; Vieira Ramos *et al.*, 2016). Así, todo parece indicar que el frío local no altera el proceso de regeneración muscular (Shibaguchi *et al.*, 2016, 2019; Vieira Ramos *et al.*, 2016), mientras que, la exposición intermitente al frío ambiental utilizada en el presente trabajo sí que parece producir mejoras en la regeneración muscular (**Figura 26**).

3.2.2. Colágeno I y fibrosis

El proceso de reparación comienza con la deposición de matriz extracelular en el lugar de la lesión, la cual tiene lugar hacia la primera semana post-lesión y es mediada por la actividad de los fibroblastos en respuesta a factores de crecimiento como TGF- β 1. A pesar de que la deposición de colágeno tiene una función fisiológica beneficiosa para el mantenimiento de la arquitectura muscular tras una lesión, la sobreproducción de colágeno puede generar fibrosis, que comportará efectos adversos en la reparación del tejido y en la función muscular (Souza and Gottfried, 2013; Laumonier and Menetrey, 2016; Forcina *et al.*, 2020). El colágeno I/III y la fibronectina han sido identificados como elementos clave en la caracterización de la fibrosis (Souza & Gottfried, 2013; Laumonier & Menetrey, 2016; Forcina *et al.*, 2020). La fibronectina y el colágeno III son unas de las primeras proteínas expresadas por la ECM durante el proceso de regeneración muscular, mientras que el colágeno I es activado posteriormente y se mantiene elevado durante las siguientes semanas (Kääriäinen *et al.*, 2000).

Reducir la fibrosis es uno de los objetivos de muchos de los tratamientos utilizados para la regeneración muscular. Agentes anti-fibróticos, plasma rico en plaquetas, actividad física temprana, etc., son procedimientos utilizados con el fin de evitar la

excesiva deposición de colágeno en el lugar de la lesión (Huard *et al.*, 2002; Contreras-Muñoz *et al.*, 2017). Y es que, más allá de la importancia de la activación de las células satélite, el control de la deposición de colágeno es fundamental en todo proceso de regeneración muscular ya que un exceso de material conectivo puede comprometer la disponibilidad de factores de crecimiento y la migración de las células satélite (Vieira Ramos *et al.*, 2016).

Con el fin de conocer el efecto real de nuestros tratamientos sobre la fibrosis, analizamos la deposición de colágeno I en la zona lesionada. 9 días después de la lesión el grupo HYPO presentó valores significativamente inferiores que los grupos CTRL y COLD en el porcentaje de colágeno detectado en la zona de la lesión (**Figura 26E**). Además, el grupo tratado con frío + hipoxia (COHY) también presentó un porcentaje de colágeno I significativamente menor que el grupo CTRL (**Figura 26E**). A los 21 días sufrir la lesión las diferencias entre grupos disminuyeron, aunque todavía se observó una clara tendencia del grupo HYPO hacia valores inferiores respecto al resto de grupos (**Figura 26E**).

En estudios previos en los que el frío local fue utilizado como tratamiento se observó que una única aplicación de frío durante 20 min post-lesión producía incrementos en la deposición de colágeno, tanto a corto (7 días) como a largo plazo (28 días), pero sin producir alteraciones en la infiltración de macrófagos, la proliferación y diferenciación de las células satélite, así como tampoco vieron modificada de forma significativa la expresión de miosina de desarrollo (Shibaguchi *et al.*, 2016, 2019). Vieira Ramos *et al.* (2016) realizaron un estudio basado en la aplicación de frío local de forma intermitente (30 min, 3 veces al día) y observaron una reducción del proceso inflamatorio, pero pese a ello, no vieron mejoras en la reparación muscular ni en la deposición de colágeno I/III (Vieira Ramos *et al.*, 2016). Los estudios parecen señalar que los cambios en los tiempos de aparición y desaparición de TGF- β 1 podría ser el factor responsable de la acumulación o falta de mejora en la deposición de colágeno (Shibaguchi *et al.*, 2016; Vieira Ramos *et al.*, 2016). Nuestros resultados apuntan a que el frío intermitente ambiental sí que mejora el proceso de regeneración muscular, pero sin lograr mejoras en la fibrosis o

deposición de colágeno, en línea con los trabajos publicados previamente (**Figura 26**)(Shibaguchi *et al.*, 2016, 2019; Vieira Ramos *et al.*, 2016).

Basándonos en nuestros resultados, la exposición intermitente a la hipoxia podría postularse como un interesante agente antifibrótico, mientras que todo parece indicar que la exposición al frío no consigue modular la deposición de colágeno (Shibaguchi *et al.*, 2016, 2019; Vieira Ramos *et al.*, 2016). En cuanto al posible efecto que pueda causar la combinación de frío e hipoxia de forma simultánea, el grupo COHY presentó resultados similares a los del grupo HYPO tras 9 días tratamiento, mientras que sus valores en el porcentaje de deposición de colágeno tras 21 días se asemejaron al comportamiento del grupo COLD.

3.3. Respuestas moleculares

La vía de señalización Akt/mTOR ha sido detalladamente estudiada y descrita, demostrándose su importancia en el crecimiento muscular, la hipertrofia y la regeneración (Zhang *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2019). Trabajos previos han podido constatar el papel de las proteínas Akt y mTOR, y sus reguladas proteínas diana p70S6K y 4EBP1, en las diferentes etapas de la regeneración muscular ya que estas cuatro proteínas muestran un incremento en sus formas fosforiladas respecto a sus formas nativas ya un día después de generarse una lesión muscular. Los aumentos de estas proteínas se mantienen en el tiempo, pudiendo apreciarse incrementos significativos de las formas fosforiladas respecto a las nativas de mTOR, p70S6K y 4EBP1 7 días post-lesión, pero sólo observándose a los 14 días post-lesión incrementos en las proteínas diana p70S6K y 4EBP1 (Chaillou *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2018). Por su parte, Pereira *et al.* (2014) 10 días después de inducir una criolesión muscular no encontraron cambios ni en el ratio pSer²⁴⁴⁸mTOR/mTOR total ni en la forma fosforilada de 4EBP1, mientras que sí que observaron incrementos significativos en la forma fosforilada de p70S6K. Nuestros resultados coinciden con los trabajos previamente mencionados puesto que no hemos observado a 9 días después de la lesión diferencias en el ratio pSer⁴⁷³Akt/Akt total ni en el ratio pSer²⁴⁴⁸mTOR/mTOR total entre las patas lesionadas y no lesionadas del grupo CTRL (**Figura 27E y Figura 28E**). Además, ninguno de los cuatro

grupos experimentales ha mostrado diferencias en estas proteínas entre los músculos lesionados y sus contralaterales no lesionados. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la presente investigación, así como los previamente publicados, podría concluirse que la vía Akt/mTOR es activada post-lesión y cobra importancia en el proceso de regeneración muscular durante los primeros días (aproximadamente 7 días), mientras que parece que en estadios más avanzados (a partir de los 10 días) su peso es menor (Pereira *et al.*, 2014; Chaillou *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2018).

En cuanto al ratio pThr¹⁷²AMPK α /AMPK α total, en concordancia con trabajos previos, tampoco se han detectado diferencias significativas entre los músculos lesionados y no lesionados del grupo CTRL, ni a 9 ni a 21 días, pese a que el GAS lesionado parece presentar una tendencia a incrementar su expresión en los primeros días post-lesión (**Figura 29E-F**) (Chaillou *et al.*, 2014). Una vez más, no se han observado diferencias significativas entre las patas lesionadas y sus contralaterales no lesionadas en ninguno de los tres grupos experimentales sometidos a tratamiento (**Figura 29E-F**).

Si fijamos nuestra atención en los efectos que la exposición a diferentes estímulos estresantes tiene sobre el tejido muscular, nuestros resultados muestran que los animales expuestos a frío intermitente durante 9 días incrementan en los músculos no lesionados la expresión de la forma fosforilada respecto a la nativa en las tres proteínas estudiadas (Akt, mTOR, AMPK) (**Figura 27F**, **Figura 28F** y **Figura 29F**), en concordancia con estudios previamente publicados (Sepa-Kishi *et al.*, 2017). La exposición al frío produce un incremento del consumo de glucosa por parte del músculo esquelético con la finalidad de sostener el alto consumo de oxígeno requerido por la ST activada para la termorregulación. Esta glucosa es principalmente utilizada a través del metabolismo oxidativo, el cual se ve sobre-regulado a través de vías independientes de insulina. Además, el todavía elevado metabolismo y consumo de glucosa por parte del músculo durante la aclimatación al frío cuando la NST es activada, es sostenido gracias a, entre otras cosas, el consumo de glucosa independiente de insulina (Sepa-Kishi *et al.*, 2017). En este contexto, AMPK se postula como un potencial mecanismo que puede facilitar la utilización de sustratos a través de vías independientes de insulina durante la exposición al frío (Sepa-Kishi *et al.*, 2017). Por su parte Akt regula el consumo de glucosa a través

de vías dependientes de insulina (Siques *et al.*, 2018) y, por lo tanto, su sobre-expresión podría ser un mecanismo más para facilitar el consumo de glucosa por parte del músculo durante la termogénesis (**Figura 27A**). Pese a que desconocemos el motivo por el cual este incremento de los cocientes de AMPK y mTOR únicamente tiene lugar en los músculos no lesionados, consideramos que una posible alteración en la homeostasis del músculo lesionado durante los primeros días post-lesión puede producir que las respuestas generadas para hacer frente a la respuesta termogénica se vean alteradas, reduciéndose por ello la respuesta en los músculos lesionados.

Tras 9 días de exposición a HHI se observaron incrementos en los cocientes $p\text{Thr}^{172}\text{AMPK}\alpha/\text{AMPK}\alpha$ total y $p\text{Ser}^{473}\text{Akt}/\text{Akt}$ total, siendo estos más pronunciados en los músculos lesionados (**Figura 27E**, **Figura 29E**). Sin embargo, tras 21 días estas diferencias desaparecieron en el caso de la proteína Akt, mientras que se acentuaron en AMPK (**Figura 27F**, **Figura 29F**). En cuanto a mTOR, no se observaron cambios en el cociente proteína fosforilada/total a 9 días, mientras que tras 21 de exposición a hipoxia intermitente el GAS no lesionado presentó valores significativamente inferiores que el grupo CTRL.

Algunos estudios en animales en los que una hipoxia hipobárica severa (5.500 m) fue aplicada de forma continua no constataron cambios en la expresión de la forma fosforilada respecto a la total de la proteína AMPK, ni tras una exposición aguda (3-7 días), ni tras una exposición crónica (12-28 días) en ninguno de los dos músculos que estudiaron (SOL y plantaris) (Chaillou *et al.*, 2012, 2014). Sin embargo, todo parece indicar que el tipo de exposición a la hipoxia (crónica vs. intermitente) podría ser un factor determinante para justificar las discrepancias entre resultados, ya que, aunque la hipoxia crónica no produzca cambios en el cociente $p\text{Thr}^{172}\text{AMPK}\alpha/\text{AMPK}\alpha$ total ni a corto ni a largo plazo (Chaillou *et al.*, 2014; Siques *et al.*, 2018), la hipoxia aplicada de forma intermitente sí que produce incrementos en el ratio $p\text{Thr}^{172}\text{AMPK}\alpha/\text{AMPK}\alpha$ total (**Figura 29E-F**) (Siques *et al.*, 2018). En cuanto a los efectos de la hipoxia sobre el músculo lesionado, trabajos previos han observado un incremento significativo de la forma fosforilada de AMPK respecto a su forma nativa tras la exposición a la hipoxia en los primeros tres días post-lesión, mientras que no han sido detectados más cambios en

etapas posteriores de la regeneración muscular (Chaillou *et al.*, 2014). Sin embargo, nosotros sí que hemos podido identificar incrementos en la ratio $p\text{Thr}^{172}\text{AMPK}\alpha/\text{AMPK}\alpha$ total tras 9 y 21 días en el músculo lesionado (**Figura 29E-F**).

Nuestros resultados muestran un incremento significativo de la ratio $p\text{Ser}^{473}\text{Akt}/\text{Akt}$ total respecto al grupo CTRL tras 9 días de exposición a HHI en el músculo no lesionado, mientras que estas diferencias tienden a disminuir tras 21 días de exposición (**Figura 27 E-F**). Estos resultados se contraponen a trabajos previos en los que tanto la hipoxia crónica como la hipoxia intermitente fueron aplicadas, y en los cuales no se apreciaron diferencias ni a corto (5-12 días) ni a largo plazo (30 días) ni en el músculo plantar ni en el SOL en la ratio $p\text{Ser}^{473}\text{Akt}/\text{Akt}$. Fijando la atención en mTOR, en este caso nuestros resultados sí que coinciden con los previamente reportados por Chaillou *et al.* (2012), no encontrándose en ambos trabajos cambios en la ratio $p\text{Ser}^{2448}\text{mTOR}/\text{mTOR}$ total en los primeros días, pero observándose una disminución paulatina de la expresión de esta proteína con el paso del tiempo, hasta alcanzar en nuestro caso una disminución significativa a los 21 días en el músculo GAS no lesionado (**Figura 28E**). Además, las proteínas diana de mTOR, p70S6K y 4E-BP1, no se mostraron significativamente afectadas tras la exposición a hipoxia severa ni durante un corto periodo (3 días), ni durante un periodo más largo (28 días) (Chaillou *et al.*, 2014). Así, parece que la HHI a largo plazo produce reducciones en la expresión de mTOR en consecuencia con los aumentos de AMPK, pero independientemente de la actividad de Akt (Chaillou *et al.*, 2014).

En cuanto a la regulación de la vía Akt/mTOR durante la regeneración muscular en condiciones de hipoxia, Chaillou *et al.* (2014) observaron que la hipoxia crónica no afectaba a la expresión de Akt y sus formas fosforiladas en el músculo lesionado. Sin embargo, en nuestro caso hemos podido observar la sobre-expresión de la forma fosforilada de Akt respecto a la nativa durante los primeros días (**Figura 27E**). Por lo que a mTOR se refiere, nosotros no hemos observado modificaciones en su expresión en el músculo lesionado ni a 9 ni a 21 días (**Figura 28E-F**). La proteína mTOR juega un papel importante en la síntesis de proteínas, diferenciación de mioblastos y crecimiento de miotubos durante el proceso de regeneración muscular (Chaillou *et al.*, 2014). La

ausencia de alteraciones significativas en esta proteína en el músculo lesionado tras la exposición a la hipoxia puede ser una señal de que la hipoxia aplicada de forma intermitente no altera el proceso de regeneración muscular de forma negativa. Evidencias previas indican que la respuesta de regeneración prevalece sobre la señal hipóxica, ya que la proteína REDD1 (*Regulated in development and DNA damage response 1*), inhibidora de mTOR, incrementa su expresión a nivel muscular en situación de hipoxia pero no lo hace cuando el músculo sometido a hipoxia se encuentra en un proceso de regeneración muscular (Chaillou *et al.*, 2014). De forma que, a pesar de que tras 21 días de HHI la expresión de mTOR aparezca reducida en el músculo no lesionado, esta situación se revierte cuando procesos como la miogénesis y el crecimiento fibrilar post-lesión tienen lugar.

Hasta dónde alcanza nuestro conocimiento, no se han descrito con anterioridad los efectos de la exposición combinada al frío y a la hipoxia en la regulación de la masa muscular. Tras estudiar diferentes marcadores moleculares con el fin de conocer el efecto real de la combinación de ambos estímulos, hemos podido observar que el grupo COHY presenta, al igual que el resto de los grupos de intervención, un incremento significativo respecto al grupo CTRL de la ratio pSer⁴⁷³Akt/Akt total tras 9 días (**Figura 27F**). Además, hemos observado un aumento significativo del cociente pSer²⁴⁴⁸mTOR/mTOR total durante los primeros días de intervención (**Figura 28F**). Sin embargo, a 21 días, estas diferencias desaparecen y la expresión de estas dos proteínas es muy similar a la encontrada en el grupo CTRL. En cuanto al sensor energético AMPK, no se han observado alteraciones en la activación de esta proteína, no viéndose alterada ante la exposición a dos estímulos estresantes como el frío y la hipoxia (**Figura 29E-F**).

Los resultados claramente nos indican la no existencia de un efecto aditivo ante la aplicación concurrente de frío e hipoxia. De hecho, los resultados parecen indicar que la aplicación simultánea de frío + hipoxia lleva a un comportamiento de los mecanismos de regulación de la vía Akt/mTOR similares a los obtenidos en hipoxia, mientras que en cuanto a AMPK, parece que el estrés energético producido en el grupo COHY podría ser similar al producido cuando el frío es aplicado de forma aislada.

Nuestros resultados han mostrado un incremento significativo de la relación pSer⁴⁷³Akt/Akt total tanto en el músculo lesionado como en el no lesionado de todos los grupos intervenidos. Akt es esencial para el desarrollo, crecimiento, regeneración y metabolismo del músculo esquelético. Además, se ha descrito su papel fundamental en la diferenciación y mantenimiento de los mioblastos, y su necesaria actividad para la maduración de las miofibras (Gardner *et al.*, 2012). La mejora en la regeneración muscular observada en los tres grupos de intervención podría estar ligada con la sobreexpresión de la forma fosforilada de Akt (**Figura 27E**) detectada en estos grupos experimentales. El papel de Akt en la regeneración muscular como respuesta al frío, a la hipoxia y al frío y la hipoxia deberá ser motivo de futuras investigaciones para dilucidar sus posibles efectos y mecanismos de acción.

Desafortunadamente, las respuestas moleculares observadas en la presente investigación no muestran resultados que puedan ayudarnos a entender claramente los porqués de los resultados obtenidos a nivel histológico y funcional en el músculo tras la lesión. Esto puede deberse a tres motivos: El primero puede estar relacionado con la alta dispersión registrada en los grupos, seguramente a causa del pequeño número de muestras con el que se ha contado para su análisis molecular. El segundo motivo podría ser el avanzado estado de la recuperación muscular en los puntos temporales de muestreo utilizados, en los que la influencia de estas proteínas podría ya ser menor o casi residual sobre la lesión. La posible tercera razón es que la señal molecular relacionada con la regeneración que hubiéramos querido identificar mediante western blot haya podido quedarse diluida parcialmente, ya que la lesión representa un volumen relativamente pequeño en relación a todo el músculo.

3.4. Resumen *Bloque 3*

Por lo tanto, y resumiendo todo lo anteriormente visto, podemos considerar que el frío intermitente acelera el proceso de regeneración muscular, ya que tras 9 días induce una mejora en la maduración de las fibras musculares de nueva formación (reducción en el porcentaje de fibras dMHC⁺ y con núcleos centrales). Además, esta mejora observada a nivel histológico tras 9 días se refleja en una recuperación de los principales

parámetros de fuerza a 21 días. Sin embargo, a pesar de las mejoras en el proceso miogénico, el frío intermitente no modula la deposición de colágeno I en el lugar de la lesión y, por lo tanto, su uso como terapia puede ser cuestionado, ya que debido a la fibrosis generada en el lugar de la lesión, el tejido muscular puede verse debilitado de cara a posteriores acciones mecánicas de alta intensidad. La elevación de la ratio $p\text{Ser}^{473}\text{Akt}/\text{Akt total}$ podría haber favorecido la activación de las células satélite en una fase inicial, pero la ausencia de correlación con mTOR exige un mayor estudio sobre el papel de Akt y la vía de señalización Akt/mTOR para poder entender de forma precisa de qué modo esta vía ha podido influir sobre el proceso de regeneración muscular. La sobreexpresión de Akt, mTOR y AMPK en el músculo no lesionado durante los primeros días de ICE podría verse regulada por un incremento en el consumo de glucosa por parte del músculo, tanto por vías insulino-dependientes como independientes, con motivo de la termorregulación. Sin embargo, esta actividad de las proteínas AMPK y mTOR podría verse alterada en el músculo lesionado debido a la disrupción de la homeostasis producida por la lesión muscular, mientras que, la expresión de Akt en el músculo lesionado podría verse acentuada debido a su papel en la regeneración muscular.

En cuanto a la HHI, este tratamiento ha mostrado de forma consistente su efectividad en la aceleración de la regeneración muscular. La hipoxia intermitente reduce el porcentaje de fibras positivas en dMHC y con núcleos centrales en los primeros 9 días, llegando a mostrar tras este corto periodo de tiempo de tratamiento un tejido muscular de unas características histológicas similares al observado tras 21 días de recuperación pasiva. Además, el grupo HYPO mostró una reducción en la deposición de colágeno I en el lugar de la lesión, postulándose así la hipoxia como un posible tratamiento anti-fibrótico que mejora el tejido muscular post-lesión brindándolo de mayor fortaleza y elasticidad. A nivel funcional la hipoxia favorece la restauración completa de la función muscular del GAS lesionado en tan sólo 9 días. Los elevados niveles de AMPK nos indican que el estímulo hipóxico produce un estrés energético importante en el músculo esquelético, siendo este más marcado en el músculo lesionado, donde la homeostasis se ha podido encontrar afectada tanto por la lesión como por la hipoxia. Sería necesario un estudio más profundo, para comprender si los incrementos en las ratios de las

proteínas AMPK y Akt han podido tener un papel relevante en las mejoras observadas en la regeneración muscular del grupo HYPO.

Por último, la combinación de ambos estímulos no ha producido el efecto aditivo que podríamos esperar en la mejora de la regeneración muscular, pero tampoco ha supuesto un estrés metabólico tan intenso como para que el proceso de regeneración muscular se haya visto afectado negativamente. Así, tanto a nivel funcional como histológico, el grupo COHY ha seguido la estela del grupo COLD, observándose mejoras en la regeneración muscular a nivel histológico (9 días) y funcional (21 días), pero sin tener efectos beneficiosos sobre la deposición de colágeno en el lugar de la lesión. A nivel molecular, los resultados parecen indicar que la respuesta observada se asemeja en mayor medida al grupo CTRL.

Resumen discusión

4. Resumen general de la discusión

El diseño experimental del presente trabajo ha demostrado ser óptimo para el estudio de las lesiones musculares y su proceso de regeneración muscular. Por un lado, los resultados obtenidos en el estudio han servido para confirmar la similitud histológica y funcional de los músculos gastrocnemios derecho e izquierdo, y por lo tanto, legitimar el uso del modelo experimental de la pierna unilateral, en el cual un músculo es utilizado para ser intervenido y el contralateral es utilizado como control. Además, esta validación de la simetría muscular ha permitido el análisis único de uno de los gastrocnemios a la hora de realizar los análisis morfológicos y moleculares diseñados. Por otro lado, el método de lesión quirúrgico ha demostrado ser idóneo y fácilmente replicable para el estudio de las lesiones musculares. Así, las respuestas observadas tanto a nivel histológico como funcional han validado el uso de este método de lesión para simular una lesión deportiva de grado II.

Una vez validado el diseño experimental, se prosiguieron a investigar los efectos de la exposición intermitente al frío, a la hipoxia y al frío + hipoxia sobre la fisiología de los animales y su posible uso como herramienta terapéutica en la regeneración muscular. La exposición intermitente al frío ha mostrado ser eficaz a la hora de preservar el bienestar de los animales, garantizando el crecimiento de los animales y el incremento de la masa muscular, pero además, ha demostrado ser un eficaz método de aclimatación al frío. El frío intermitente produce adaptaciones anatómicas, como incrementos del BAT, induce respuestas musculares dirigidas a mejorar el aporte de oxígeno (incrementos en la capilarización muscular) e incrementa el consumo de glucosa (incrementos de las proteínas GLUT1, AMPK, Akt y mTOR), con la finalidad de mejorar la termorregulación. Por otro lado, la exposición al frío ha demostrado mejorar el proceso de regeneración muscular, acelerando la maduración de las fibras de nueva formación (9 días) y la restauración de la función contráctil del músculo (21 días), pero sin mejorar la fibrosis post-lesión. La mejora en la capilarización muscular, que favorece el aporte de oxígeno y nutrientes y la eliminación de desechos, así como los incrementos en la expresión de Akt podrían ser los motivos de la mejora en la regeneración muscular observada y, por lo tanto, profundizar en estos aspectos podría ser de gran interés.

El uso intermitente de la hipoxia hipobárica es una interesante herramienta de cara a prevenir los efectos deletéreos de la hipoxia, como la pérdida de masa corporal y muscular, mientras que incrementa el transporte de oxígeno a nivel hematológico e induce respuestas musculares destinadas a mejorar la irrigación del músculo. Además, nuestros resultados la postulan como una potencial herramienta para la regeneración muscular, ya que hemos podido observar que la hipoxia hipobárica intermitente acelera el crecimiento y maduración de las fibras musculares en el lugar de la lesión en tan solo 9 días a la vez que reduce la deposición de colágeno, mejorando la arquitectura de la zona lesionada. En esta misma línea, se ha comprobado que la función muscular es completamente restaurada tras 9 días de HHI, mientras que tras una recuperación pasiva la capacidad contráctil del músculo se ve todavía afectada tras 21 días. La activación de Akt, pero sobre todo de AMPK, a causa de la exposición a la hipoxia, junto con la mejora de la irrigación muscular, podrían ser aspectos a estudiar en el futuro debido a su posible vinculación en la mejora de la regeneración muscular y en la reducción de la fibrosis observada.

Por último, la exposición simultánea al frío y la hipoxia y el posible efecto sinérgico generado al combinar estos dos estímulos ha sido uno de nuestros principales focos de interés. El uso simultáneo de ambos estímulos no ha supuesto un estrés perjudicial para los animales, ya que han mantenido su crecimiento y la masa muscular a lo largo de la intervención. Además, la hipoxia no ha afectado a la aclimatación al frío de los animales, a juzgar por el incremento significativo del BAT observado. Por otro lado, el uso simultáneo del frío y de la hipoxia parece producir un interesante efecto cardioprotector ante afecciones relacionadas con la hipoxia como PAH. El aporte de oxígeno durante la exposición al frío y a la hipoxia a nivel tisular puede verse realmente comprometido, debido al incremento en la demanda y la disminución en la disponibilidad de oxígeno. De hecho, la exposición concurrente al frío y a la hipoxia produce un efecto aditivo en las respuestas hematológicas destinadas a mejorar el transporte de oxígeno e incrementa las adaptaciones morfológicas destinadas a mejorar la irrigación de las fibras musculares. En cuanto al papel del frío y de la hipoxia simultánea en la regeneración muscular podemos concluir que a pesar de no haber observado una mejora en relación con los resultados obtenidos con la hipoxia y con el frío por separado, la exposición

simultánea a ambos estímulos no ha interferido negativamente sobre el proceso de regeneración muscular. De hecho, el frío + la hipoxia acelera la maduración de las fibras musculares tras la lesión (9 días) y la recuperación de la función muscular (21 días), pero sólo mejora la deposición de colágeno a corto plazo (9 días). En este caso, la mejora de la irrigación del tejido, así como una activación de Akt en las primeras etapas de la regeneración muscular (9 días), podrían ser aspectos clave que hayan podido producir la aceleración de la regeneración muscular observada.

Conclusiones

1. Los resultados obtenidos confirman la existencia de una simetría bilateral del músculo gastrocnemio tanto a nivel morfológico (tamaño y proporción de fibras) como a nivel funcional (capacidad para generar fuerza y resistencia a la fatiga). Por lo tanto, queda validada la metodología de pata unilateral, así como el uso de un único músculo gastrocnemio por cada animal en los análisis morfológicos y moleculares realizados.
2. El método quirúrgico utilizado para inducir la lesión muscular demuestra ser adecuado para el estudio de la regeneración muscular, ya que muestra evidencias tanto funcionales como histológicas de lesión muscular 24h post-lesión.
3. El frío intermitente produce respuestas de aclimatación al frío como el incremento del tejido adiposo marrón, de la capilarización muscular y del consumo de glucosa muscular, mientras que mantiene la masa corporal y muscular de los animales.
4. La hipoxia hipobárica intermitente preserva el crecimiento y masa de los animales, produciendo incrementos en la masa muscular y reduciendo la masa grasa. Además, aumenta el transporte de oxígeno en sangre y mejora la irrigación de las fibras musculares a través de la reducción del tamaño de las fibras, pero sin producir angiogénesis.
5. La combinación del frío y de la hipoxia no interfiere en la aclimatación al frío de los animales, además, no supone un estrés patológico para las ratas, ya que tras la exposición a estos dos estímulos de forma simultánea los animales mantienen su crecimiento e incrementan la masa muscular.
6. El frío y la hipoxia concurrentes producen un efecto cardioprotector frenando la hipertrofia ventricular derecha derivada de la hipertensión pulmonar hipóxica.
7. A nivel hematológico, la exposición a frío e hipoxia produce un efecto sinérgico en el transporte de oxígeno, mayor al detectado ante la exposición aislada a cada uno de estos dos estímulos. Además, se ha observado que estos dos factores

ambientales de forma conjunta mejoran la irrigación fibrilar por medio de la reducción del área transversal de las fibras, pero sin producir una respuesta de angiogénesis ni una activación de la vía de señalización HIF-1 α .

8. El frío intermitente acelera el proceso de regeneración muscular, mostrando evidencias histológicas a 9 días y funcionales a 21 días. Sin embargo, incrementa la deposición de colágeno I en el lugar de la lesión, aumentando la formación de tejido fibrótico.
9. Tras 9 días de hipoxia hipobárica intermitente el músculo lesionado muestra una recuperación total de la función muscular y evidencias histológicas de un acelerado proceso de reparación. Además, la hipoxia intermitente reduce la deposición de tejido conectivo en el lugar de la lesión reduciendo la fibrosis. Lo que desvela un interesante papel de la hipoxia hipobárica intermitente como una herramienta útil para la aceleración del *"return to play"*.
10. La exposición simultánea a hipoxia hipobárica y frío no produce un efecto aditivo con respecto a la exposición a estos dos estímulos por separado en la regeneración muscular. Sin embargo, si que mejora el proceso de regeneración, como así lo demuestran las evidencias histológicas a 9 días y la recuperación de la capacidad funcional del músculo lesionado a los 21 días. No obstante, el uso de estos dos estímulos incrementa la deposición de colágeno I en el lugar de la lesión.
11. Los grupos COLD y COHY han manifestado un incremento en el cociente pSer⁴⁷³Akt/Akt total tras 9 días de tratamiento, postulándose esta proteína como posible elemento clave en la aceleración de la regeneración muscular.
12. Los incrementos significativos observados en las relaciones pSer⁴⁷³Akt/Akt total y pThr¹⁷²AMPK α /tAMPK α total en el grupo HYPO abre puertas a considerar el potencial papel de estas dos proteínas en la aceleración de la regeneración muscular.

Conclusions

1. Our results confirm the existence of a bilateral symmetry between right and left gastrocnemius muscles, both at a morphological level (fibres size and fibre type proportion) and at a functional level (force capacity and resistance to fatigue). Therefore, the unilateral leg methodology has been validated, as well as the use of a single gastrocnemius muscle from each animal to perform the morphological and molecular analyses.
2. The surgically-induced injury proved to be optimal for the study of muscle regeneration process, as it showed functional and histological evidence of muscle injury 24 h post-injury.
3. Intermittent cold exposure produced acclimatization responses to cold, such as increments of brown adipose tissue, muscle capillarity and muscle glucose uptake, while maintained rats' body weight and muscle mass.
4. Intermittent hypobaric hypoxia preserved the growth and weight of animals, producing increments on the muscle mass and reducing fat mass. In addition, it increased oxygen transport in the blood and improved the irrigation of the muscle fibres by reducing the fibres' size, but without producing angiogenesis.
5. The combination of cold and hypoxia did not interfere in the cold acclimatization of the rats. Moreover, it did not produced a pathological stress since, after the simultaneous exposure to these two stimuli, the animals maintained their growth and increased their muscle mass.
6. Concurrent cold and hypoxia exposure produced a cardioprotective effect against the right ventricle hypertrophy caused by pulmonary arterial hypertension.
7. At the hematological level, exposure to cold and hypoxia produced a synergistic effect on oxygen transport, greater than the effect observed with isolated exposure to each of these two stimuli. In addition, it has been observed that the combination of these two environmental factors improved myofibrillar irrigation

through a reduction in the fibres' cross-sectional area, but without inducing an angiogenesis response nor an activation of the HIF-1 α signalling pathway.

8. Intermittent cold exposure accelerated the muscle regeneration process, showing histological evidence after 9 days and functional evidence at 21 days. However, it increased collagen I deposition in the injury site, promoting the formation of fibrotic tissue.
9. After 9 days of intermittent hypobaric hypoxia the injured muscles showed an accelerated muscle repair process, with a total functional and histological recovery. Moreover, intermittent hypoxia reduced the deposition of connective tissue at the site of injury, thus diminishing fibrosis. This evidence suggests an interesting role of intermittent hypobaric hypoxia as a useful tool for accelerating the "return to play".
10. Simultaneous exposure to hypobaric hypoxia and cold did not produce an additive effect on muscle regeneration compared to the effect observed by the exposure to these two stimuli separately. The concurrent cold and hypoxia intermittent exposure improved the muscle regeneration process, demonstrated by histological evidence after 9 days and by the recovery of the functional capacity of the injured muscles after 21 days. However, the use of these two stimuli increased collagen I deposition at the site of injury.
11. COLD and COHY groups showed an increased pSer⁴⁷³Akt/total Akt ratio after 9 days of treatment, postulating this protein as a possible key element involved in the observed acceleration of the muscle regeneration process.
12. The significant increases of pSer⁴⁷³Akt/total Akt and pThr¹⁷²AMPK α /total AMPK α ratios observed in HYPO group open new approaches to consider the potential role of these proteins in the acceleration of muscle regeneration process after intermittent hypobaric hypoxia.

Bibliografía

- Albert V & Hall MN (2015). mTOR signaling in cellular and organismal energetics. *Curr Opin Cell Biol* **33**, 55–66.
- Armstrong R & Phelps R (1984). Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am J Anat* **171**, 259–272.
- Attwaters M & Hughes SM (2021). Cellular and molecular pathways controlling muscle size in response to exercise. *FEBS J*. *En prensa*.
- Banchero N, Kayar S & Lechner A (1985). Increased capillarity in skeletal muscle of growing guinea pigs acclimated to cold and hypoxia. *Respir Physiol* **62**, 245–255.
- Banfi G, Lombardi G, Colombini A & Melegati G (2010). Whole-body cryotherapy in athletes. *Sports Med* **40**, 509–517.
- Beaudry M, Hidalgo M, Launay T, Bello V & Darribère T (2016). Regulation of myogenesis by environmental hypoxia. *J Cell Sci* **129**, 2887–2896.
- Blaauw B, Canato M, Agatea L, Toniolo L, Mammucari C, Masiero E, Abraham R, Sandri M, Schiaffino S & Reggiani C (2009). Inducible activation of Akt increases skeletal muscle mass and force without satellite cell activation. *FASEB J* **23**, 3896–3905.
- Bouzigon R, Grappe F, Ravier G & Dugue B (2016). Whole- and partial-body cryostimulation/cryotherapy: Current technologies and practical applications. *J Therm Biol* **61**, 67–81.
- Breen E, Tang K, Olfert M, Knapp A & Wagner P (2008). Skeletal muscle capillarity during hypoxia: VEGF and its activation. *High Alt Med Biol* **9**, 158–166.
- Brito J, Siques P & Pena E (2020). Long-term chronic intermittent hypoxia: A particular form of chronic high-altitude pulmonary hypertension. *Pulm Circ* **10**, 5–12.

Brooke MH & Kaiser KK (1970). Muscle fiber types: How many and what kind? *Arch Neurol* **23**, 369–379.

Bukowieckh LJ (1989). Energy balance and diabetes. The effects of cold exposure, exercise training, and diet composition on glucose tolerance and glucose metabolism in rat peripheral tissues. *Can J Physiol Pharmacol* **67**, 382–393.

Butler PJ, Brown AJ, Stephenson DG & Speakman JR (2021). *Animal Physiology: An environmental perspective*, 1st edn. Oxford University Press, Oxford.

Cabrera-Aguilera I, Rizo-Roca D, Marques EA, Santocildes G, Pagès T, Viscor G, Ascensão AA, Magalhães J & Torrella JR (2018). Additive effects of intermittent hypobaric hypoxia and endurance training on bodyweight, food intake, and oxygen consumption in rats. *High Alt Med Biol* **19**, 278–285.

Carreau A, Hafny-Rahbi B el, Matejuk A, Grillon C & Kieda C (2011). Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med* **15**, 1239–1253.

Casas H, Casas M, Ricart A, Rama R, Ibáñez J, Palacios L, Rama R, Palacios L, Rodríguez FA, Ventura JL, Viscor G & Pagés T (2000). Effectiveness of three short intermittent hypobaric hypoxia protocols hematological responses. *J Exerc Physiol* **3**, 38–45.

Chaillou T, Koulmann N, Meunier A, Pugnère P, McCarthy JJ, Beaudry M & Bigard X (2014). Ambient hypoxia enhances the loss of muscle mass after extensive injury. *Pflugers Arch* **466**, 587–598.

Chaillou T, Koulmann N, Simler N, Meunier A, Serrurier B, Chapot R, Peinnequin A, Beaudry M & Bigard X (2012). Hypoxia transiently affects skeletal muscle hypertrophy in a functional overload model. *Am J Physiol* **302**, R643–R654.

- Chaillou T & Lanner JT (2016). Regulation of myogenesis and skeletal muscle regeneration: Effects of oxygen levels on satellite cell activity. *FASEB J* **30**, 3929–3941.
- Chargé SBP & Rudnicki MA (2004). Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev* **84**, 209–238.
- Ciciliot S & Schiaffino S (2010). Regeneration of mammalian skeletal muscle: Basic mechanisms and clinical implications. *Curr Pharm Des* **16**, 906–914.
- Contreras-Muñoz P, Fernández-Martín A, Torrella JR, Serres X, de La Varga M, Viscor G, Järvinen TAH, Martínez-Ibáñez V, Peiró JL, Rodas G & Marotta M (2016). A new surgical model of skeletal muscle injuries in rats reproduces human sports lesions. *Int J Sports Med* **37**, 183–190.
- Contreras-Muñoz P, Torrella JR, Serres X, Rizo-Roca D, de La Varga M, Viscor G, Martínez-Ibáñez V, Peiró JL, Järvinen TAH, Rodas G & Marotta M (2017). Postinjury exercise and platelet-rich plasma therapies improve skeletal muscle healing in rats but are not synergistic when combined. *Am J Sports Med* **45**, 2131–2141.
- Contreras-Muñoz P, Torrella JR, Venegas V, Serres X, Vidal L, Vila I, Lahtinen I, Viscor G, Martínez-Ibáñez V, Peiró JL, Järvinen TAH, Rodas G & Marotta M (2021). Muscle precursor cells enhance functional muscle recovery and show synergistic effects with postinjury treadmill exercise in a muscle injury model in rats. *Am J Sports Med* **49**, 1073–1085.
- da Costa Santos VB, Correa JCM, Chierotti P, Ballarin GS, de Oliveira Toginho Filho D, Nakamura FY & de Paula Ramos S (2019). Cold water immersion or LED therapy after training sessions: Effects on exercise-induced muscle damage and performance in rats. *Lasers Med Sci* **34**, 991–999.

- Debevec T, Bali TC, Simpson EJ, Macdonald IA, Eiken O & Mekjavic IB (2014). Separate and combined effects of 21-day bed rest and hypoxic confinement on body composition. *Eur J Appl Physiol* **114**, 2411–2425.
- Deveci C & Egginton S (2003). Cold exposure differentially stimulates angiogenesis in glycolytic and oxidative muscles of rats and hamsters. *Exp Physiol* **88**, 741–746.
- Deveci D & Egginton S (2002). Differing mechanisms of cold-induced changes in capillary supply in m. tibialis anterior of rats and hamsters. *J Exp Biol* **205**, 829–840.
- Deveci D, Marshall JM & Egginton S (2001a). Relationship between capillary angiogenesis, fiber type, and fiber size in chronic systemic hypoxia. *Am J Physiol* **281**, H241–H252.
- Deveci D, Marshall JM & Egginton S (2002). Chronic hypoxia induces prolonged angiogenesis in skeletal muscles of rat. *Exp Physiol* **87**, 287–291.
- Deveci D, Stone PCW & Egginton S (2001b). Differential effect of cold acclimation on blood composition in rats and hamsters. *J Comp Physiol B* **171**, 135–143.
- Dueweke JJ, Awan TM & Mendias CL (2017). Regeneration of skeletal muscle after eccentric injury. *J Sport Rehabil* **26**, 171–179.
- Dünnwald T, Gatterer H, Faulhaber M, Arvandi M & Schobersberger W (2019). Body composition and body weight changes at different altitude levels: A systematic review and meta-analysis. *Front Physiol* **10**, 430.
- Edouard P, Branco P & Alonso JM (2016). Muscle injury is the principal injury type and hamstring muscle injury is the first injury diagnosis during top-level international athletics championships between 2007 and 2015. *Br J Sports Med* **50**, 619–630.

- Egginton S (2002). Temperature and angiogenesis: The possible role of mechanical factors in capillary growth. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **132**, 773–787.
- Egginton S, Fairney J & Bratcher J (2001). Differential effects of cold exposure on muscle fibre composition and capillary supply in hibernator and non-hibernator rodents. *Exp Physiol* **86**, 629–639.
- El-Khoury R, Bradford A & O'halloran KD (2012). Chronic hypobaric hypoxia increases isolated rat fast-twitch and slow-twitch limb muscle force and fatigue. *Physiol Res* **61**, 195–201.
- Esteva S, Panisello P, Torrella JR, Pagés T & Viscor G (2009). Blood rheology adjustments in rats after a program of intermittent exposure to hypobaric hypoxia. *High Alt Med Biol* **10**, 275–281.
- Facco M, Zilli C, Siviero M, Ermolao A, Travain G, Baesso I, Bonamico S, Cabrelle A, Zaccaria M & Agostini C (2005). Modulation of immune response by the acute and chronic exposure to high altitude. *Med Sci Sports Exerc* **37**, 768–774.
- Faucher M, Guillot C, Marqueste T, Kipson N, Mayet-Sornay MH, Desplanches D, Jammes Y & Badier M (2005). Matched adaptations of electrophysiological, physiological, and histological properties of skeletal muscles in response to chronic hypoxia. *Pflugers Arch* **450**, 45–52.
- Favier FB, Britto FA, Freyssenet DG, Bigard XA & Benoit H (2015). HIF-1-driven skeletal muscle adaptations to chronic hypoxia: Molecular insights into muscle physiology. *Cell Moll Life Sci* **72**, 4681–4696.
- Flores K, Siques P, Brito J, Ordenes S, Arriaza K, Pena E, León-Velarde F, López R, López de Pablo AL & Arribas S (2020). Lower body weight in rats under hypobaric hypoxia

exposure would lead to reduced right ventricular hypertrophy and increased AMPK activation. *Front Physiol* **11**, 342.

Forcina L, Cosentino M & Musarò A (2020). Mechanisms regulating muscle regeneration: Insights into the interrelated and time-dependent phases of tissue healing. *Cells* **9**, 1297.

Fouces V, Torrella JR, Palomeque J & Viscor G (1993). A histochemical ATPase method for the demonstration of the muscle capillary network. *J Histochem Cytochem* **41**, 283–289.

Freyssenet D (2007). Energy sensing and regulation of gene expression in skeletal muscle. *J Appl Physiol* **102**, 529–540.

Fu X, Wang H & Hu P (2015). Stem cell activation in skeletal muscle regeneration. *Cell Mol Life Sci* **72**, 1663–1677.

Fukada S, Akimoto T & Sotiropoulos A (2020). Role of damage and management in muscle hypertrophy: Different behaviors of muscle stem cells in regeneration and hypertrophy. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1867**, 118742.

Gardner S, Anguiano M & Rotwein P (2012). Defining Akt actions in muscle differentiation. *Am J Physiol* **303**, C1292–C1300.

Gautier H, Bonora M, M'barek SB & Sinclair JD (1991). Effects of hypoxia and cold acclimation on thermoregulation in the rat. *J Appl Physiol* **71**, 1355–1363.

Granberg PO (1991). Human physiology under cold exposure. *Arctic Med Res* **50 Suppl 6**, 23–27.

Guo Z & Zhou L (2003). Substrate concentration and metabolism in left and right muscles of rats. *Metabolism* **52**, 1571–1575.

- Hägglund M, Waldén M & Ekstrand J (2006). Previous injury as a risk factor for injury in elite football: A prospective study over two consecutive seasons. *Br J Sports Med* **40**, 767–772.
- Hamilton B, Valle X, Rodas G, Til L, Pruna-Grive R, Gutierrez-Rincon JA & Tol JL (2015). Classification and grading of muscle injuries: a narrative review. *Br J Sports Med* **49**, 306.
- Head SI, Houweling PJ, Chan S, Chen G & Hardeman EC (2014). Properties of regenerated mouse extensor digitorum longus muscle following notexin injury. *Exp Physiol* **99**, 664–674.
- Heinicke K, Prommer N, Cajigal J, Viola T, Behn C & Schmidt W (2003). Long-term exposure to intermittent hypoxia results in increased hemoglobin mass, reduced plasma volume, and elevated erythropoietin plasma levels in man. *Eur J Appl Physiol* **88**, 535–543.
- Hohtola E (2004). Shivering Thermogenesis in Birds and Mammals. In *Life in the Cold: Evolution, Mechanisms, Adaptation, and Application. Twelfth International Hibernation Symposium*, pp. 241–252. Fairbanks: Institute of Artiz Biology, University of Alaska.
- Hoppeler H & Vogt M (2001). Muscle tissue adaptations to hypoxia. *J Exp Biol* **204**, 3133–3139.
- Hoppeler H, Vogt M, Weibel ER & Flück M (2003). Response of skeletal muscle mitochondria to hypoxia. *Exp Physiol* **88**, 109–119.
- Horwath O, Envall H, Röja J, Emanuelsson EB, Sanz G, Ekblom B, Apró W & Moberg M (2021). Variability in vastus lateralis fiber type distribution, fiber size and myonuclear content along and between the legs. *J Appl Physiol* **131**, 158–173.

- Huard J, Li Y & Fu FH (2002). Muscle injuries and repair: Current trends in research. *J Bone Joint Surg Am* **84**, 822–832.
- Ingalls CP, Warren GL & Armstrong R (1998). Dissociation of force production from MHC and actin contents in muscles injured by eccentric contractions. *J Muscle Res Cell Motil* **19**, 215–224.
- Ishihara A, Itoh K, Itoh M & Hirofuji C (2000). Effect of hypobaric hypoxia on rat soleus muscle fibers and their innervating motoneurons: A review. *Jpn J Physiol* **50**, 561–568.
- Itoh K, Moritani TI, Ishida K, Hirofuji C, Taguchi S & Itoh M (1990). Hypoxia-induced fibre type transformation in rat hindlimb muscles. Histochemical and electro-mechanical changes. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **60**, 331–336.
- Jackson CGR, Sillau AH & Banchemo N (1987). Fiber composition and capillarity in growing guinea pigs acclimated to cold and cold plus hypoxia. *Proc Soc Exp Biol Med* **185**, 101–106.
- Järvinen TA, Järvinen M & Kalimo H (2014). Regeneration of injured skeletal muscle after the injury. *Muscles Ligaments Tendons J* **3**, 337–345.
- Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Äärimaa V, Vaittinen S, Kalimo H & Järvinen M (2007). Muscle injuries: Optimising recovery. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **21**, 317–331.
- Jash S & Adhya S (2015). Effects of transient hypoxia versus prolonged hypoxia on satellite cell proliferation and differentiation in vivo. *Stem Cells Int* **2015**, 961307.
- Kääriäinen M, Järvinen T, Järvinen M, Rantanen J & Kalimo H (2000). Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. *Scand J Med Sci Sports* **10**, 332–337.

- Kayser B, Narici M, Milesi S, Grassi B & Cerretelli P (1993). Body composition and maximum alactic anaerobic performance during a one month stay at high Altitude. *Int J Sports Med* **14**, 244–247.
- Ke Q & Costa M (2006). Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* **70**, 1469–1480.
- Kenney WL, Wilmore JH & Costill DL (2014). *Fisiología del deporte y el ejercicio*, 5th edn. Editorial Médica Panamericana., Madrid.
- Kertesz A, Polk M, Black SE & Howell J (1992). Anatomical asymmetries and functional laterality. *Brain* **115**, 589–605.
- Kjøbsted R, Hingst JR, Fentz J, Foretz M, Sanz MN, Pehmøller C, Shum M, Marette A, Mounier R, Treebak JT, Wojtaszewski JFP, Viollet B & Lantier L (2018). AMPK in skeletal muscle function and metabolism. *FASEB J* **32**, 1741–1777.
- Kujala UM, Orava S & Järvinen M (1997). Hamstring injuries. Current trends in treatment and prevention. *Sports Med* **23**, 397–404.
- Laumonier T & Menetrey J (2016). Muscle injuries and strategies for improving their repair. *J Exp Orthop* **3**, 15.
- Lehmann T, Mairböurl H, Pleisch B, Maggiorini M, Bärtzsch P & Reinhart WH (2006). Platelet count and function at high altitude and in high-altitude pulmonary edema. *J Appl Physiol* **100**, 690–694.
- León-Velarde F, Sanchez J, Bigard AX, Brunet A, Lesty C & Monge C (1993). High altitude tissue adaptation in Andean coots: capillarity, fibre area, fibre type and enzymatic activities of skeletal muscle. *J Comp Physiol B* **163**, 52–58.
- Lexell J, Jarvis JC, Currie J, Downham DY & Salmons S (1994). Fibre type composition of rabbit tibialis anterior and extensor digitorum longus muscles. *J Anat* **185**, 95–101.

- Lexell J & Taylor C (1991). A morphometrical comparison of right and left whole human vastus lateralis muscle: How to reduce sampling errors in biopsy techniques. *Clin Physiol* **11**, 271–276.
- Li Y, Cummins J & Huard J (2001). Muscle injury and repair. *Curr Opin Orthop* **12**, 409–415.
- Liu W, Wen Y, Bi P, Lai X, Liu XS, Liu X & Kuang S (2012). Hypoxia promotes satellite cell self-renewal and enhances the efficiency of myoblast transplantation. *Development* **139**, 2857–2865.
- Liu X, Zeng Z, Zhao L, Xiao W & Chen P (2018). Changes in inflammatory and oxidative stress factors and the protein synthesis pathway in injured skeletal muscle after contusion. *Exp Ther Med* **15**, 2196–2202.
- Lloyd AC (2013). The regulation of cell size. *Cell* **154**, 1194–1205.
- Lombardi G, Ziemann E & Banfi G (2017). Whole-body cryotherapy in athletes: From therapy to stimulation. An updated review of the literature. *Front Physiol* **8**, 258.
- López Chicharro J & Fernández Vaquero Almudena (2006). *Fisiología del ejercicio*, 3rd edn. Editorial Médica Panamericana, Madrid.
- Luks AM, Ainslie PN, Lawley JS, Roach RC & Simonson TS (2021). *High altitude medicine and physiology*, 6th edn. CRC Press, Boca Raton.
- Lundby C, Calbet JAL & Robach P (2009). The response of human skeletal muscle tissue to hypoxia. *Cell Mol Life Sci* **66**, 3615–3623.
- Lunt HC, Barwood MJ, Corbett J & Tipton MJ (2010). “Cross-adaptation”: Habituation to short repeated cold-water immersions affects the response to acute hypoxia in humans. *J Physiol* **588**, 3605–3613.

- Ma TT, Wang Y, Zhou XL, Jiang H, Guo R, Jia LN, Chang H, Gao Y, Yao XY, Gao ZM & Pan L (2015). Research on rat models of hypobaric hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **19**, 3723–3730.
- Maekawa S, Iemura H & Kato T (2013). Enhanced erythropoiesis in mice exposed to low environmental temperature. *J Exp Biol* **216**, 901–908.
- Maffulli N, Oliva F, Frizziero A, Nanni G, Barazzuol M, Via AG, Ramponi C, Brancaccio P, Lisitano G, Rizzo D, Freschi M, Galletti S, Melegati G, Pasta G, Testa V, Valent A & del Buono A (2014). ISMuLT guidelines for muscle injuries. *Muscles Ligaments Tendons J* **3**, 241–249.
- Malanga GA, Yan N & Stark J (2015). Mechanisms and efficacy of heat and cold therapies for musculoskeletal injury. *Postgrad Med* **127**, 57–65.
- Malliaropoulos N, Isinkaye T, Tsitak K & Maffulli N (2011). Reinjury after acute posterior thigh muscle injuries in elite track and field athletes. *Am J Sports Med* **39**, 304–310.
- Mantovani J & Roy R (2011). Re-evaluating the general(ized) roles of AMPK in cellular metabolism. *FEBS Lett* **585**, 967–972.
- Masiero E, Agatea L, Mammucari C, Blaauw B, Loro E, Komatsu M, Metzger D, Reggiani C, Schiaffino S & Sandri M (2009). Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab* **10**, 507–515.
- Mathieu-Costello O (2001). Muscle adaptation to altitude: Tissue capillarity and capacity for aerobic metabolism. *High Alt Med Biol* **2**, 413–425.
- McArthur S, Juban G, Gobbetti T, Desgeorges T, Theret M, Gondin J, Toller-Kawahisa JE, Reutelingsperger CP, Chazaud B, Perretti M & Mounier R (2020). Annexin A1 drives macrophage skewing to accelerate muscle regeneration through AMPK activation. *J Clin Invest* **130**, 1156–1167.

- Mila-Kierzenkowska C, Jurecka A, Woźniak A, Szpinda M, Augustyńska B & Woźniak B (2013). The effect of submaximal exercise preceded by single whole-body cryotherapy on the markers of oxidative stress and inflammation in blood of volleyball players. *Oxid Med Cell Longev* **2013**, 409567.
- Mirrahimov AE & Strohl KP (2016). High-altitude pulmonary hypertension: An update on disease pathogenesis and management. *Open Cardiovasc Med J* **10**, 19–27.
- Mizunoya W, Iwamoto Y, Sato Y, Tatsumi R & Ikeuchi Y (2014). Cold exposure increases slow-type myosin heavy chain 1 (MyHC1) composition of soleus muscle in rats. *Anim Sci J* **85**, 293–304.
- le Moal E, Pialoux V, Juban G, Groussard C, Zouhal H, Chazaud B & Mounier R (2017). Redox control of skeletal muscle regeneration. *Antioxid Redox Signal* **27**, 276–310.
- Moore LG, Niermeyer S & Zamudio S (1998). Human adaptation to high altitude: Regional and life-cycle perspectives. *Am J Phys Anthropol Suppl* **27**, 25–64.
- Mounier R, Théret M, Arnold L, Cuvellier S, Bultot L, Göransson O, Sanz N, Ferry A, Sakamoto K, Foretz M, Viollet B & Chazaud B (2013). AMPK α 1 regulates macrophage skewing at the time of resolution of inflammation during skeletal muscle regeneration. *Cell Metab* **18**, 251–264.
- Mueller-Wohlfahrt HW, Haensel L, Mithoefer K, Ekstrand J, English B, McNally S, Orchard J, van Dijk N, Kerkhoffs GM, Schamasch P, Blottner D, Swaerd L, Goedhart E & Uebliacker P (2013). Terminology and classification of muscle injuries in sport: The Munich consensus statement. *Br J Sports Med* **47**, 342–350.
- Muza SR, Beidleman BA & Fulco CS (2010). Altitude preexposure recommendations for inducing acclimatization. *High Alt Med Biol* **11**, 87–92.

- Nachlas MM, Tsou K, de Souza E, Cheng C & Seligman AM (1957). Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J Histochem Cytochem* **5**, 420–436.
- Nadler SF, Weingand K & Kruse RJ (2004). The physiologic basis and clinical applications of cryotherapy and thermotherapy for the pain practitioner. *Pain Physician* **7**, 395–399.
- Navarrete-Opazo A & Mitchell GS (2014). Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose. *Am J Physiol* **307**, R1181–R1197.
- Neubauer JA (2001). Invited review: Physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* **90**, 1593–1599.
- Núñez-Espinosa C, Douziech A, Ríos-Kristjánsson JG, Rizo D, Torrella JR, Pagès T & Viscor G (2014). Effect of intermittent hypoxia and exercise on blood rheology and oxygen transport in trained rats. *Respir Physiol Neurobiol* **192**, 112–117.
- Núñez-Espinosa C, Ferreira I, Ríos-Kristjánsson JG, Rizo-Roca D, García Godoy MD, Rico LG, Rubi-Sans G, Torrella JR, Pagès T, Petriz J & Viscor G (2015). Effects of intermittent hypoxia and light aerobic exercise on circulating stem cells and side population, after strenuous eccentric exercise in trained rats. *Curr Stem Cell Res Ther* **10**, 132–139.
- Ortiz-Prado E, Dunn JF, Vasconez J, Castillo D & Viscor G (2019). Partial pressure of oxygen in the human body: a general review. *Am J Blood Res* **9**, 1–14.
- Pak O, Aldashev A, Welsh D & Peacock A (2007). The effects of hypoxia on the cells of the pulmonary vasculature. *Eur Respir J* **30**, 364–372.

- Panisello P, Torrella JR, Esteva S, Pagés T & Viscor G (2008). Capillary supply, fibre types and fibre morphometry in rat tibialis anterior and diaphragm muscles after intermittent exposure to hypobaric hypoxia. *Eur J Appl Physiol* **103**, 203–213.
- Panisello P, Torrella JR, Pagés T & Viscor G (2007). Capillary supply and fiber morphometry in rat myocardium after intermittent exposure to hypobaric hypoxia. *High Alt Med Biol* **8**, 322–330.
- Pereira MG, Baptista IL, Carlassara EOC, Moriscot AS, Aoki MS & Miyabara EH (2014). Leucine supplementation improves skeletal muscle regeneration after cryolesion in rats. *PLoS One* **9**, e85283.
- Peter J, Barnard R, Edgerton V, Gillespie C & Stempel K (1972). Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry* **11**, 2627–2633.
- Pollock N, James SLJ, Lee JC & Chakraverty R (2014). British athletics muscle injury classification: a new grading system. *Br J Sports Med* **48**, 1347–1351.
- Pournot H, Bieuzen F, Louis J, Mounier R, Fillard JR, Barbiche E & Hausswirth C (2011). Time-course of changes in inflammatory response after whole-body cryotherapy multi exposures following severe exercise. *PLoS One* **6**, e22748.
- Prabhakar NR (2006). O₂ sensing at the mammalian carotid body: Why multiple O₂ sensors and multiple transmitters? *Exp Physiol* **91**, 17–23.
- Pries AR & Secomb TW (2014). Making microvascular networks work: Angiogenesis, remodeling, and pruning. *Physiology* **29**, 446–455.
- Rab M, Neumayer CH, Koller R, Kamolz L-P, Haslik W, Gassner R, Giovanoli P, Schaden G & Frey M (2000). Histomorphology of rabbit thigh muscles: establishment of standard control values. *J Anat* **196**, 203–209.

- Ramos-Romero S, Santocildes G, Piñol-Piñol D, Rosés C, Pagés T, Hereu M, Amézqueta S, Torrella JR, Torres JL & Viscor G (2020). Implication of gut microbiota in the physiology of rats intermittently exposed to cold and hypobaric hypoxia. *PLoS One* **15**, e0240686.
- Ravussin Y, Xiao C, Gavrilova O & Reitman ML (2014). Effect of intermittent cold exposure on brown fat activation, obesity, and energy homeostasis in mice. *PLoS One* **9**, e85876.
- Rezende EL & Bacigalupe LD (2015). Thermoregulation in endotherms: physiological principles and ecological consequences. *J Comp Physiol B* **185**, 709–727.
- Rion N, Castets P, Lin S, Enderle L, Reinhard JR, Eickhorst C & Rüegg MA (2019). Mtor controls embryonic and adult myogenesis via mtorc1. *Development* **146**, dev172460.
- Rizo-Roca D, Bonet JB, Ínal B, Ríos-Kristjánsson JG, Pagès T, Viscor G & Torrella JR (2018). Contractile activity is necessary to trigger intermittent hypobaric hypoxia-induced fiber size and vascular adaptations in skeletal muscle. *Front Physiol* **9**, 481.
- Rizo-Roca D, Ríos-Kristjánsson JG, Núñez-Espinosa C, Santos-Alves E, Gonçalves IO, Magalhães J, Ascensão A, Pagès T, Viscor G & Torrella JR (2017a). Intermittent hypobaric hypoxia combined with aerobic exercise improves muscle morphofunctional recovery after eccentric exercise to exhaustion in trained rats. *J Appl Physiol* **122**, 580–592.
- Rizo-Roca D, Ríos-Kristjánsson JG, Núñez-Espinosa C, Santos-Alves E, Magalhães J, Ascensão A, Pagès T, Viscor G & Torrella JR (2017b). Modulation of mitochondrial biomarkers by intermittent hypobaric hypoxia and aerobic exercise after eccentric exercise in trained rats. *Appl Physiol Nutr Metab* **42**, 683–693.

- Roberts JC (2011). Thermogenic responses to prolonged cold exposure: Birds and mammals. *Comprehensive Physiology* 399–418.
- Rocke AS, Paterson GG, Barber MT, Jackson AIR, Main SE, Stannett C, Schnopp MF, MacInnis M, Baillie JK, Horne EH, Moores C, Harrison P, Nimmo AF & Thompson AAR (2018). Thromboelastometry and platelet function during acclimatization to high altitude. *Thromb Haemost* **118**, 63–71.
- Rodríguez FA, Ventura JL, Casas M, Casas H, Pagés T, Rama R, Ricart A, Palacios L & Viscor G (2000). Erythropoietin acute reaction and haematological adaptations to short, intermittent hypobaric hypoxia. *Eur J Appl Physiol* **82**, 170–177.
- Salceda S & Caro J (1997). Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* **272**, 22642–22647.
- Sandri M, Barberi L, Bijlsma AY, Blaauw B, Dyar KA, Milan G, Mammucari C, Meskers CGM, Pallafacchina G, Paoli A, Pion D, Roceri M, Romanello V, Serrano AL, Toniolo L, Larsson L, Maier AB, Muñoz-Cánoves P, Musarò A, Pende M, Reggiani C, Rizzuto R, Schiaffino S (2013). Signalling pathways regulating muscle mass in ageing skeletal muscle the role of the IGF1-Akt-mTOR-FoxO pathway. *Biogerontology* **14**, 303–323.
- Schaeffer P, Villarín J & Lindstedt S (2003). Chronic cold exposure increases skeletal muscle oxidative structure and function in monodelphis domestica, a marsupial lacking brown adipose tissue. *Physiol Biochem Zool* **76**, 877–887.
- Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B & Sandri M (2013). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J* **280**, 4294–4314.
- Schiaffino S & Reggiani C (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* **91**, 1447–1531.

- Schiaffino S, Rossi AC, Smerdu V, Leinwand LA & Reggiani C (2015). Developmental myosins: Expression patterns and functional significance. *Skelet Muscle* **5**, 22.
- Schiaffino S, Sandri M & Murgia M (2007). Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity. *Physiology* **22**, 269–278.
- Semenza G (1998). Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis. *J Lab Clin Med* **131**, 207–214.
- Semenza GL (2009). Involvement of oxygen-sensing pathways in physiologic and pathologic erythropoiesis. *Blood* **114**, 2015–2019.
- Sepa-Kishi DM, Sotoudeh-Nia Y, Iqbal A, Bikopoulos G & Ceddia RB (2017). Cold acclimation causes fiber type-specific responses in glucose and fat metabolism in rat skeletal muscles. *Sci Rep* **7**, 15430.
- Shadrin IY, Khodabukus A & Bursac N (2016). Striated muscle function, regeneration, and repair. *Cell Mol Life Sci* **73**, 4175–4202.
- Shang C, Wuren T, Ga Q, Bai Z, Guo L, Eustes AS, McComas KN, Rondina MT & Ge R (2020). The human platelet transcriptome and proteome is altered and pro-thrombotic functional responses are increased during prolonged hypoxia exposure at high altitude. *Platelets* **31**, 33–42.
- Shibaguchi T, Hoshi M, Yoshihara T, Naito XH, Goto K, Yoshioka T & Sugiura T (2019). Impact of different temperature stimuli on the expression of myosin heavy chain isoforms during recovery from bupivacaine-induced muscle injury in rats. *J Appl Physiol* **127**, 178–189.
- Shibaguchi T, Sugiura T, Fujitsu T, Nomura T, Yoshihara T, Naito H, Yoshioka T, Ogura A & Ohira Y (2016). Effects of icing or heat stress on the induction of fibrosis and/or regeneration of injured rat soleus muscle. *J Physiol Sci* **66**, 345–357.

- Shiota S, Okada T, Naitoh H, Ochi R & Fukuchi Y (2004). Hypoxia and hypercapnia affect contractile and histological properties of rat diaphragm and hind limb muscles. *Pathophysiology* **11**, 23–30.
- Silverthorn DU (2019). *Fisiología humana: un enfoque integrado*, 8th edn. Editorial Médica Panamericana, Ciudad de México.
- Simon MC & Keith B (2008). The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 285–296.
- Siques P, Brito J, Flores K, Ordenes S, Arriaza K, Pena E, León-Velarde F, de Pablo ÁLL, Gonzalez MC & Arribas S (2018). Long-term chronic intermittent hypobaric hypoxia induces glucose transporter (GLUT4) translocation through AMP-activated protein kinase (AMPK) in the soleus muscle in lean rats. *Front Physiol* **9**, 799.
- Siques P, Brito J, León-Velarde F, Barrios L, Cruz JJD la, López V & Herruzo R (2006). Time course of cardiovascular and hematological responses in rats exposed to chronic intermittent hypobaric hypoxia (4600 m). *High Alt Med Biol* **7**, 72–80.
- Souza J de & Gottfried C (2013). Muscle injury: Review of experimental models. *J Electromyogr Kinesiol* **23**, 1253–1260.
- Stancic A, Buzadzic B, Korac A, Otasevic V, Jankovic A, Vucetic M, Markelic M, Velickovic K, Golic I & Korac B (2013). Regulatory role of PGC-1 α /PPAR signaling in skeletal muscle metabolic recruitment during cold acclimation. *J Exp Biol* **216**, 4233–4241.
- Stocks JM, Taylor NA, Tipton MJ & Greenleaf JE (2004). Human physiological responses to cold exposure. *Aviat Space Environ Med* **75**, 444–457.
- Suzuki J, Gao M, Ohinata H, Kuroshima A & Koyama T (1997). Chronic cold exposure stimulates microvascular remodeling preferentially in oxidative muscles in rats. *Jpn J Physiol* **47**, 513–520.

- Tarnopolsky M, Phillips S, Parise G, Varbanov A, Demuth J, Stevens P, Qu A, Wang F & Isfort R (2007). Gene expression, fiber type, and strength are similar between left and right legs in older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **62**, 1088–1095.
- Templeman NM, Beaudry JL, le Moine CMR & McClelland GB (2010). Chronic hypoxia- and cold-induced changes in cardiac enzyme and gene expression in CD-1 mice. *Biochim Biophys Acta* **1800**, 1248–1255.
- Theret M, Gsaier L, Schaffer B, Juban G, ben Larbi S, Weiss-Gayet M, Bultot L, Collodet C, Foretz M, Desplanches D, Sanz P, Zang Z, Yang L, Vial G, Viollet B, Sakamoto K, Brunet A, Chazaud B & Mounier R (2017). AMPK α 1-LDH pathway regulates muscle stem cell self-renewal by controlling metabolic homeostasis. *EMBO J* **36**, 1946–1962.
- Thomson DM (2018). The role of AMPK in the regulation of skeletal muscle size, hypertrophy, and regeneration. *Int J Mol Sci* **19**, 3125.
- Tidball JG (2011). Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. *Compr Physiol* **1**, 2029–2062.
- Tiidus PM (2008). *Skeletal Muscle Damage and Repaired*. Human Kinetics, United States of America.
- Tortora GJ & Derrickson B (2013). *Principios de Anatomía y Fisiología*, 13th edn. Editorial Médica Panamericana, Ciudad de México.
- Tortora GJ & Derrickson B (2018). *Principios de anatomía y fisiología*, 15th edn. Editorial Médica Panamericana, Ciudad de México.
- Tortora GJ & Grabowski S reinols (2002). *Principles of Anatomy and Physiology*, 10th edn. Wiley, New York.

- Tsibul'nikov SYu, Maslov LN, Naryzhnaya N v., Ivanov V v. & Lishmanov YuB (2016). Specific features of adaptation of rats to chronic cold treatment. *Dokl Biol Sci* **470**, 214–216.
- Turner NJ & Badylak SF (2012). Regeneration of skeletal muscle. *Cell Tissue Res* **347**, 759–774.
- Valle X, Malliaropoulos N, Párraga Botero JD, Bikos G, Pruna R, Mónaco M & Maffulli N (2018). Hamstring and other thigh injuries in children and young athletes. *Scand J Med Sci Sports* **28**, 2630–2637.
- Vallerand AL, Péruusse F & Bukowiecki LJ (1990). Stimulatory effects of cold exposure and cold acclimation on glucose uptake in rat peripheral tissues. *Am J Physiol* **259**, R1043–R1049.
- Vieira Ramos G, Pinheiro CM, Messa SP, Delfino GB, Marqueti RDC, Salvini TDF & Durigan JLQ (2016). Cryotherapy reduces inflammatory response without altering muscle regeneration process and extracellular matrix remodeling of rat muscle. *Sci Rep* **6**, 18525.
- Viganò A, Ripamonti M, de Palma S, Capitanio D, Vasso M, Wait R, Lundby C, Cerretelli P & Gelfi C (2008). Proteins modulation in human skeletal muscle in the early phase of adaptation to hypobaric hypoxia. *Proteomics* **8**, 4668–4679.
- Vij AG (2009). Effect of prolonged stay at high altitude on platelet aggregation and fibrinogen levels. *Platelets* **20**, 421–427.
- Vinegar A & Hillyard SD (1972). The effects of altitude on oxygen-binding parameters of the blood of the iguanid lizards, *Sceloporus jarrovi* and *Sceloporus occidentalis*. *Comp Biochem Physiol* **43A**, 317–320.

- Viscor G, Torrella J, Fouces V & Palomeque J (1992). Skeletal muscle capillarization and fiber types in urban and homing pigeons (*Columba livia*). *Comp Biochem Physiol A* **101**, 751–757.
- Viscor G, Torrella JR, Corral L, Ricart A, Javierre C, Pages T & Ventura JL (2018). Physiological and biological responses to short-term intermittent hypobaric hypoxia exposure: From sports and mountain medicine to new biomedical applications. *Front Physiol* **9**, 814.
- Wang GL, Jiang B-H, Rue EA & Semenza GL (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension (dioxin receptor/erythropoietin/hypoxia/transcription). *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5510–5514.
- Warren GL, Lowe DA & Armstrong RB (1999). Measurement tools used in the study of eccentric contraction-induced injury. *Sports Med* **27**, 43–59.
- Warren P, Gabbe BJ, Schneider-Kolsky M & Bennell KL (2010). Clinical predictors of time to return to competition and of recurrence following hamstring strain in elite Australian footballers. *Br J Sports Med* **44**, 415–419.
- Wei X, Luo L & Chen J (2019). Roles of mTOR signaling in tissue regeneration. *Cells* **8**, 1075.
- Wenger RH & Hoogewijs D (2010). Regulated oxygen sensing by protein hydroxylation in renal erythropoietin-producing cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **298**, F1287–F1296.
- Whalen RG, Harris JB, Butler-Browne GS & Sesodia S (1990). Expression of myosin isoforms during notexin-induced regeneration of rat soleus muscles. *Dev Biol* **141**, 24–40.

WHO (2021). WHO: World Health Organization. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/musculoskeletal-conditions> [Accessed September 5, 2021].

Widmaier EP, Raff H & Strang KT (2006). *Vander's Human Physiology*, 10th edn. McGraw-Hill, New York.

Yang X, Yang S, Wang C & Kuang S (2017). The hypoxia-inducible factors HIF1 α and HIF2 α are dispensable for embryonic muscle development but essential for postnatal muscle regeneration. *J Biol Chem* **292**, 5981–5991.

Yoo HS, Qiao L, Bosco C, Leong L-H, Lytle N, Feng G-S, Chi N-W & Shao J (2014). Intermittent cold exposure enhances fat accumulation in mice. *PLoS One* **9**, e96432.

Zhang H, Dong H, Mehmood K, Li K, Nabi F, Chang Z, Rehman MU, Ijaz M, Wu Q & Li J (2018). Physiological variations among blood parameters of domestic cats at high- and low-altitude regions of China. *Arch Physiol Biochem* **124**, 458–460.

Zhang P, Liang X, Shan T, Jiang Q, Deng C, Zheng R & Kuang S (2015). mTOR is necessary for proper satellite cell activity and skeletal muscle regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* **463**, 102–108.

Ziemann E, Olek RA, Kujach S, Grzywacz T, Antosiewicz J, Garsztka T & Laskowski R (2012). Five-day whole-body cryostimulation, blood inflammatory markers, and performance in high-ranking professional tennis players. *J Athl Train* **47**, 664–672.

Ibili, erori eta altxatzearen oinarrizko legea

(Berri Txarrak musika taldea)

La regla básica de andar, caer y levantarse

(Grupo de musika Berri Txarrak)



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Tesis doctoral
Barcelona 2021

