



Exposición intermitente a altitud simulada y ejercicio para la recuperación del daño muscular: células madre circulantes y ajustes hemorreológicos en ratas entrenadas

Cristian Núñez Espinosa



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**



FACULTAT DE BIOLOGIA

DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA I IMMUNOLOGIA

**EXPOSICIÓN INTERMITENTE A ALTITUD
SIMULADA Y EJERCICIO PARA LA
RECUPERACIÓN DEL DAÑO MUSCULAR:
CÉLULAS MADRE CIRCULANTES Y
AJUSTES HEMORREOLÓGICOS EN RATAS
ENTRENADAS**

TESIS DOCTORAL

Cristian Núñez Espinosa

**EXPOSICIÓN INTERMITENTE A ALTITUD
SIMULADA Y EJERCICIO PARA LA
RECUPERACIÓN DEL DAÑO MUSCULAR:
CÉLULAS MADRE CIRCULANTES Y AJUSTES
HEMORREOLÓGICOS EN RATAS ENTRENADAS**

Memoria presentada por

Cristian Núñez Espinosa

Para optar al Grado de

Doctor por la Universidad de Barcelona

Tesis realizada bajo la dirección del Dr. Ginés Viscor Carrasco del
Departamento de Fisiología e Inmunología de la Universidad de Barcelona

Adscrita al programa de doctorado en Fisiología de la Universidad de
Barcelona

Ginés Viscor Carrasco

Cristian Núñez Espinosa

Barcelona, Enero de 2015



“Exposición intermitente a altitud simulada y ejercicio para la recuperación del daño muscular: células madre circulantes y ajustes hemorreológicos en ratas entrenadas”

El autor ha sido financiado por el gobierno de Chile a través de la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICYT) – Programa de Becas Chile (PFCHA/Doctorado en el Extranjero 4ª Convocatoria, Folio 72120023)

A Ruby y Trinidad, mis dos faros inmóviles que alumbran con su amor cada paso de mi vida, llenándolo de alegrías, luz y eterna felicidad.

Agradecimientos

En mi habitación de adolescente siempre observaba un cuadro que decía:

"Que nuestros esfuerzos desafíen las imposibilidades, recordad que las grandes proezas de la historia fueron conquistas de lo que parecía imposible."

Charles Chaplin

Crecí con esta frase en mi mente, luego pasaron los años y junto a mi esposa e hija decidimos embarcarnos en una aventura por una vida mejor. Hoy es el momento de agradecer a aquellos que me ayudaron a lograrlo y contribuyeron a que esos esfuerzos dieran sus frutos.

Primero que todo agradecer a Ginés Viscor Carrasco, mi profesor y director de tesis, el cual ha sido un ejemplo como profesional, ayudándome en mi formación y guiándome en todo momento, constituyéndose en un pilar inmensamente importante durante todo este tiempo.

A mis compañeros de laboratorio: Juan Gabriel Ríos, David Rizo, Joan Ramon Torrella, Teresa Pages y Ginés Viscor, los cuales siempre me ayudaron y apoyaron en mi trabajo.

A Jordi Petriz, por su gran ayuda y experticia, lo cual me permitió dar mis primeros pasos en un mundo antes desconocido para mí.

A Juan Gabriel Ríos Kristjánsson, por su amistad y ejemplo profesional, el cual siempre estuvo dispuesto a ayudarme y dar lo mejor de sí para el bien de todos.

A mi familia en Chile, especialmente a mi madre, por su amor y entereza, la cual me entrego las primeras herramientas en la vida.

A Ruby y Trinidad, mis amadas compañeras de aventura, las cuales con su valentía y amor han permitido que mi formación profesional sea posible, recordándome que las grandes proezas si pueden ser conquistadas.

Abreviaturas

$\dot{\gamma}$:	Velocidad de deformación
τ:	Tensión de Corte
η:	Viscosidad aparente para fluidos no newtonianos
μ:	Viscosidad aparente para fluidos newtonianos
ABC:	ATP- Binding Cassette
ABCB1:	Gen codificador de P-gp
ABCG2:	Transportador de membrana de la familia ABC
ADN:	Acido desoxirribonucleico
ARNT:	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Traslocator (Traslocador del receptor nuclear de aril hidrocarburo)
Ca⁺⁺:	Catión calcio divalente
CD:	Cluster of Differentiation (Cluster de Diferenciación)
CFU-F:	Colony-Forming Units Fibroblast (Unidades formadoras de fibroblastos)
CO₂:	Dióxido de Carbono
cP:	Centipoise
CTRL:	Grupo Experimental Control
DCV:	Vybrant Dye Cycle Violet
EHYP:	Grupo experimental sometido a hipoxia hipobárica intermitente y ejercicio
EPO:	Eritropoyetina
EPOC:	Enfermedades Pulmonares Obstructivas Crónicas
FACS:	Fluorescence-Activated Cell Sorting (Clasificación de células activadas por fluorescencia)
FSC:	Forward Scatter (Dispersión Frontal)
G-CSF:	Granulocyte-Colony Stimulating Factor (Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos)
Hb:	Hemoglobina
Hc:	Hematocrito
HCO₃:	Bicarbonato
HERs:	Hypoxia Response Elements (Elementos de respuesta a la hipoxia)
HIF-1:	Hypoxia Inducible Factor (Factor inducible por hipoxia)

HLA:	Human Leukocyte Antigen
HSC:	Hematopoietic Stem Cells (Células Madre Hematopoyéticas)
HYP:	Grupo experimental sometido a hipoxia hipobárica intermitente
IH:	Intermittent Hypoxia (Hipoxia Intermitente)
IHH:	Intermittent Hypobaric Hypoxia (Hipoxia Hipobárica Intermitente)
IHH:	Intermittent Hypobaric Hypoxia (Hipoxia Hipobárica Intermitente)
IHT:	Intermittent Hypoxia Training (Entrenamiento en Hipoxia Intermitente)
iPS:	induced Pluripotent Stem Cell (Células Madre Pluripotente inducidas)
K⁺:	Catión Potasio
mAbs:	Anticuerpos monoclonales
MAPC:	Multipotent Adult Progenitor Cells (Células Progenitoras Adultas Multipotentes)
MCHC:	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media)
MCV:	Mean Corpuscular Volumen (Volumen Corpuscular Medio)
MDSC:	Muscle Derived Stem Cells (Células Madre Derivadas del Músculo)
MHC:	Mean Corpuscular Hemoglobin (Hemoglobina Corpuscular Media)
MSC:	Mesenchymal Stem Cells (Células Madre Mesenquimales)
Na⁺:	Catión Sodio
NO:	Óxido Nítrico
O₂:	Oxígeno
ODI:	Oxygen Delivery Index (Índice de Demanda de Oxígeno)
OPTI:	Oxygen Potencial Transport Index (Índice de Transporte Potencial de Oxígeno)
PAO₂:	Presión Alveolar de Oxígeno
P-gp:	Glicoproteína P
PLT:	Plaqueta
PO₂:	Presión parcial de Oxígeno
RBC:	Red Blood Cells (Eritrocitos)
SC:	Stem Cells (Células Madre)
SP:	Side Population (Células Madre de Población Lateral)
SSC:	Side Scatter (Dispersión Lateral)
TRA:	Grupo experimental entrenado

- UNT:** Grupo experimental no entrenado
- VEGF:** Vascular Endothelial Growth Factor (Factor de crecimiento endotelial vascular)
- WBC:** White Blood Cells (Leucocitos)

Contenido

Dedicatoria	7
Agradecimientos	9
Abreviaturas	11
1. INTRODUCCIÓN	19
Contexto	21
Hipótesis del estudio	22
Parte 1: La Hipoxia	23
1.1. Definición y contextualización.....	23
1.2. Como afecta la hipoxia a nuestro organismo	24
1.2.1. El mecanismo de HIF-1 como regulador de hipoxia en nuestro cuerpo	24
1.2.2. Mecanismos compensatorios.....	25
1.2.2.1. Mecanismos respiratorios	26
1.2.2.2. Mecanismos cardiovasculares	28
1.2.2.3. Mecanismos hematológicos.....	29
1.3. Tipos de hipoxia.....	30
1.3.1. Clasificación según sus causas	30
1.3.2. Clasificaciones de tipos de exposición.....	32
1.4 Hipoxia hipobárica intermitente y sus beneficios	33
Puntos claves Parte 1	39
Parte 2: Hemorreología	40
1.5. Definición.....	40
1.5.1. La sangre	40

1.5.2. El plasma.....	41
1.5.3. Elementos formes.....	41
1.5.4. Reología.....	43
1.5.5. Viscosidad.....	44
1.5.6. Viscoelasticidad de la sangre.....	50
1.5.7. Factores hemorreológicos.....	53
1.5.7.1. Factores vasculares.....	54
1.5.7.2. Factores no vasculares.....	56
Puntos claves Parte 2.....	58
Parte 3: Células madre y citometría de flujo.....	59
1.6. Células madre.....	59
1.6.1. Historia y evolución de células madre.....	59
1.6.2. Definición y características.....	61
1.6.3. Clasificación según estado evolutivo.....	62
1.6.3.1. Células madre embrionarias o germinales.....	62
1.6.3.2. Células madre somáticas o adultas.....	62
1.6.4. Clasificación según su potencial celular.....	64
1.6.5. Células madre en medula ósea.....	65
1.6.5.1. Células madre mesenquimales (MSC).....	66
1.6.5.2 Células madre hematopoyéticas.....	66
1.6.5.3. Side Population.....	68
1.6.5.4. Células progenitoras multipotentes adultas.....	69
1.6.5.5. Células Ovais.....	70

1.6.6. La relación existente entre las células madre, la hipoxia y el ejercicio.....	71
1.6.6.1. <i>Hipoxia y células madre</i>	71
1.6.6.2. <i>Ejercicio y células madre</i>	73
1.7. Citometría de flujo e inmunotipificación de células madre.....	75
1.7.1. CD45	77
1.7.2. CD34	78
1.7.3. DCV	79
Puntos claves Parte 3.....	81
2. OBJETIVOS	83
3. INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL SOBRE EL IMPACTO DE LAS PUBLICACIONES	87
4. DISCUSIÓN	93
5. CONCLUSIONES	105
6. BIBLIOGRAFÍA.....	109
7. PUBLICACIONES	135
8. ANEXOS.....	191
ANEXO I	193
ANEXO II	197
ANEXO III.....	209
ANEXO IV.....	213

1. INTRODUCCIÓN

Contexto

Las lesiones del sistema musculotendinoso tienen un importante efecto en nuestra sociedad actual. Aunque muchas veces estas lesiones tienen más repercusión mediática cuando se relacionan con deportistas de élite, no se puede desconocer que en el ámbito laboral su incidencia es muy elevada correspondiendo en el año 2001 a más del 80% de las enfermedades laborales reportadas por la Unión Europea y a más del 48% de las enfermedades de origen profesional en España durante el año 2013 (Troconis *et al.*, 2008; Ministerio de Empleo y Seguridad Social, 2014)

Aunque este tipo de lesiones son abundantes, una de las limitaciones de su estudio sistemático es lo impredecibles y difícil de reproducir que son estos acontecimientos, refiriéndose a su gravedad y localización en los sujetos.

La propuesta de este estudio comienza con la inducción de daño muscular fisiológico en ratas de laboratorio, a través de una larga carga de contracción excéntrica (Komulainen *et al.*, 1994), que permita observar de forma paulatina y sin sesgos la evolución ulterior de esta lesión, en grupos homogéneos de animales bajo diferentes condiciones experimentales de recuperación.

En base a este objetivo, este trabajo ha valorado la eficacia de la hipoxia hipobárica intermitente, solo o en combinación con ejercicio ligero, como un estímulo capaz modular de manera más eficiente la regeneración de tejido muscular esquelético dañado. Para ello se comprobó:

- Si las diferentes condiciones experimentales tenían incidencia directa con los componentes hemorreológicos que signifiquen un riesgo vascular.
- Si los diferentes estímulos tenían un efecto en el aumento de células progenitoras hematopoyéticas tanto en sangre periférica como en médula ósea.

Hipótesis del estudio

La hipótesis general de este trabajo se basa en que un protocolo de hipoxia hipobárica intermitente combinada con ejercicio aeróbico ligero en normoxia, puede tener un efecto beneficioso en la regeneración de musculatura esquelética dañada y por ello pudiera contribuir a una recuperación más rápida en este tipo de lesiones.

Sin embargo, el conocido efecto hematopoyético de la exposición a hipoxia y del ejercicio, podrían afectar a la dinámica del aporte de oxígeno a los tejidos. Se hace necesario por consiguiente conocer y estudiar los potenciales efectos de estos tratamientos sobre la hematología y la reología sanguínea.

Se ha dedicado también especial atención a la presencia de células madre circulantes y a la población de “side population” en médula ósea para obtener evidencias de su posible incidencia en la dinámica del proceso de recuperación de la lesión muscular.

Parte 1: La Hipoxia

1.1. Definición y contextualización

La hipoxia se puede definir como un estado en donde existe una disminución del aporte de oxígeno a las células de nuestro organismo, limitando la producción de energía. Generalmente se relaciona con la altura y con el conjunto de alteraciones que provoca en nuestro organismo por la falta de adaptación a esta condición, siendo llamada “mal de altura”. Es así justamente, como se obtienen las primeras descripciones documentadas de hipoxia en el libro “Historia Natural y Moral de las Indias”, escrito en 1590 por el sacerdote jesuita español Padre José de Acosta, quien relata en su aventura de la conquista de América, como el paso por las montañas afectan el normal funcionamiento del cuerpo de los hombres. El sacerdote precisa que en las alturas “el aire está allí tan sutil y delicado que no se proporciona a la respiración humana, que le requiere más grueso y más templado”, siendo la causa de “alterar tan fuertemente el estómago y descomponer todo el sujeto”, según describe (Acosta, 1590).

El interés por la investigación en altura siguió creciendo y en 1878, en el libro “La Pression Barometrique”, el fisiólogo francés Paul Bert, relaciona por primera vez la presión barométrica con los cambios que experimentan las personas en altura, a consecuencia de la reducción de la capacidad de captación de oxígeno por parte del organismo (Kellogg, 1978).

Desde esta época en adelante la investigación en este campo se desarrolla abarcando cambios fisiológicos hasta a nivel molecular (West, 1998). Hoy en día sabemos que atmosfera está compuesta por oxígeno en un 21% y que la condición hipóxica provocada por la exposición a la altura afecta de manera importante la captación de oxígeno por parte de nuestro cuerpo, ya sea por la disminución de presión atmosférica como por la baja densidad del aire.

La condición hipóxica, no solo es de interés por quienes conviven en ella por razones de trabajo o deporte, sino también por los innumerables efectos que tiene sobre nuestro organismo, principalmente por la cascada de señalizaciones que provoca una serie de cambios fisiológicos de los cuales se pueden obtener beneficios para el ser humano.

Este trabajo presenta una visión diferente de la hipoxia basándose en que el organismo es capaz de adaptarse de manera favorable a los cambios provocados por la escasez de oxígeno, generando adaptaciones fisiológicas que pueden tener implicancias directas en el aumento de células madres circulantes.

1.2. Como afecta la hipoxia a nuestro organismo

1.2.1. El mecanismo de HIF-1 como regulador de hipoxia en nuestro cuerpo

La exposición a hipoxia conlleva un sin número de cambios que se producen en nuestro organismo con el fin de garantizar un correcto funcionamiento de nuestro cuerpo bajo esta condición. Los cambios más importantes se producen a nivel metabólico y hormonal regulados por un responsable: el factor inducible por hipoxia HIF-1.

HIF-1 es un heterodímero (proteína compuesta por dos subunidades diferentes), el cual cumple un rol como sensor ambiental. Este factor se une a promotores de genes diana llamados HERs (Hypoxia Response Elements) (Semenza, 1999) para luego estimular la transcripción de genes específicos, que ayuden a mantener la homeostasis en nuestro organismo.

Este complejo proteico se compone de una unidad α (HIF-1 α) y una subunidad β (HIF-1 β) o también llamada ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Transporter). En situaciones de normoxia HIF-1 α se degrada por hidroxilación y se destruye, mientras que en situación hipóxica, HIF-1 α dimeriza y se une a HIF- β , creando HIF-1.

HIF-1 funciona como el regulador transcripcional más importante frente a la respuesta condiciones hipóxicas que tiene nuestro organismo, siendo capaz de activar a más de 70 genes de manera directa y 200 genes de manera indirecta, incluyendo eritropoyetina, transportadores de glucosa, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y enzimas específicas, entre otras (Wenger, 2000, 2006; Giaccia *et al.*, 2004). Así, el factor inducible por hipoxia es el responsable de la facilitación adaptativa en condiciones metabólicas de falta de oxígeno.

No obstante, la eficiente respuesta de HIF-1 frente a la hipoxia, ha sido un importante eje de estudio por parte de la ciencia, ya que el progreso de las investigaciones ha mostrado que puede traer consecuencias favorables como desfavorables para nuestro organismo. En el caso del deporte y la salud, es bien sabido que afecta directamente a la fisiología del corazón y redes vasculares (Brusselmans *et al.*, 2003; Semenza, 2004), así como también a la función de la eritropoyetina que no solo cumple una función en la síntesis de eritrocitos, sino también como factor neuroprotector en el sistema nervioso central (Sirén & Ehrenreich, 2001). Sin embargo también existen consecuencias negativas por la activación de este factor, como los ocurridos en procesos tumorales donde HIF-1 aumenta considerablemente, acrecentando la agresividad del tumor producto de la angiogénesis que se desarrolla. Así también, HIF-1 incide en la neutralización y eliminación de ciertos fármacos a través de la estimulación del citocromo P-450 (Fradette & Du Souich, 2004), por lo que se han desarrollado estudios farmacológicos que logren inhibir HIF-1 durante procesos de tratamiento contra el cáncer, pudiendo afectar positivamente en la terapia contra esta enfermedad.

En la actualidad la investigación en la comprensión de HIF-1 como mecanismo de regulación frente a la hipoxia sigue avanzando con gran interés, lográndose comprender de mejor manera los beneficios metabólicos de esta adaptación. Además se sigue trabajando día a día para generar información de calidad que nos permita prevenir aquellos efectos adversos frente a enfermedades como en el cáncer.

1.2.2. Mecanismos compensatorios

Bajo condiciones de hipoxia hipobárica, nuestro cuerpo debe realizar variados ajustes fisiológicos basados en la mantención de una homeostasis corporal, en un entorno carente de oxígeno. Estos ajustes que llamamos mecanismos compensatorios involucran diferentes objetivos dependiendo del tipo de exposición y la duración de esta.

En términos generales es importante distinguir dos tipos de cambios que puede realizar nuestro cuerpo. El primero de ellos se produce por exposiciones temporales o transitorias, en donde se producen ajustes fisiológicos de forma progresiva, pudiendo

tardar de segundos hasta días en llevarse a cabo. A este tipo de cambio lo llamamos aclimatación, el cual puede ser reversible y solo tiene como objetivo el suministro adecuado de oxígeno en condiciones donde no lo hay. Sin embargo, existen otros tipos de cambios que se presentan más estables y definitivos en el cuerpo. Generalmente, responden a periodos de aclimataciones permanentes, que asociadas a efectos de selección natural contribuyen a que sean traspasados de generación en generación. A esto lo llamamos adaptación (Banchero, 1987).

Estos mecanismos compensatorios son muy importantes de tener en cuenta cuando sabemos que no solo montañistas ni deportistas se enfrentan a condiciones de hipoxia hipobárica, sino que millones de personas viven y trabajaban bajo este tipo de exposición (Niermeyer *et al.*, 2001) especialmente en lugares como Los Andes, el Himalaya y el este de África.

Muchas de estas personas logran adaptarse a la hipoxia hipobárica llevando a cabo ajustes fenotípicos que aún no se logran comprender con claridad (Xing *et al.*, 2008). Sin embargo, podemos identificar de manera clara, varios de los primeros cambios fisiológicos que se experimentan en la fase de adaptación, lo que nos permite conocer las diferentes variables que se modificarán en el cuerpo frente a la hipoxia hipobárica.

1.2.2.1. Mecanismos respiratorios

Sabemos que el intercambio gaseoso se produce en los alveolos entre el aire y la sangre que se encuentra en los capilares a través de difusión simple. En condiciones y altitudes normales, la presión parcial de oxígeno dentro de los alveolos es de 104 mm Hg, mientras que la presión parcial del dióxido de carbono alcanza los 40 mm Hg. Por otra parte, la sangre arterio-capilar que llega a los alveolos, presenta una presión parcial de oxígeno de 40 mm Hg y una presión de dióxido de carbono de 45 mm Hg. Estas diferencias en las presiones parciales, nos evidencia la rapidez con la que se produce el intercambio gaseoso entre el oxígeno proveniente del exterior y la sangre desoxigenada de los capilares, en condiciones normales.

No obstante en situación de hipoxia hipobárica se pueden presentar dos fenómenos ambientales que dificultan este intercambio. La primera de ellas es la disminución de presión atmosférica, lo cual conlleva a que la presión parcial de oxígeno también disminuya. La segunda es la densidad atmosférica, lo cual implica que las moléculas que componen el aire disminuyen, por tanto, hay una menor cantidad de oxígeno disponible.

Estas dos situaciones provocan que la difusión de gases se ralentice, aumentando la demanda de oxígeno por parte del cuerpo. Los quimiorreceptores periféricos ubicados en la bifurcación de la carótida y en el cayado aórtico, responden a la disminución de presión de oxígeno estimulados por la baja PaO_2 (presión arterial de oxígeno), mientras que los quimiorreceptores centrales ubicados en el bulbo raquídeo reaccionan al aumento de CO_2 . En definitiva ambos cambios químicos producidos por la acción de quimiorreceptores centrales y periféricos, responden al desajuste metabólico producido por la hipoxia, aumentan tanto en la frecuencia cardíaca, como la capacidad ventilatoria por vía refleja.

Aunque el incremento de la respuesta ventilatoria que se produce en hipoxia puede durar semanas, está comprobado que mayormente se concentra en las primeras 24 horas de exposición. Debido a esta respuesta ventilatoria comienza a producirse un incremento sostenido de hipercapnia, que solo es controlada en parte, por los cambios químicos producidos en el control respiratorio para mantener una adecuada presión de oxígeno alveolar, durante la siguiente semana (West, J.B., R.B. Schoene, 2007).

Las adaptaciones fisiológicas que ayudan también a la captación de oxígeno en situaciones de hipoxia, son la vasodilatación periférica y la vasoconstricción alveolar. La primera para privilegiar que un mayor volumen sanguíneo pueda llevar oxígeno a nuestros órganos y la segunda para mantener mayor tiempo la sangre oxigenada en los pulmones. Estas medidas, aunque en primera instancia parecen muy favorables, a largo plazo pueden conllevar problemas de hipertensión pulmonar e incluso edemas pulmonares.

Es de interés destacar, por otra parte, que la hiperventilación causada por disminución de PAO_2 (presión alveolar de oxígeno), tiene como consecuencia una mayor eliminación de CO_2 y la disminución de presión parcial tanto en la sangre como en el aire alveolar. A pesar de esto persiste el incremento de la frecuencia y amplitud de los

movimientos respiratorios. Este hecho demuestra claramente que este efecto se debe a la disminución de PO_2 en la sangre y en los tejidos. Hay que tener presente, además, que la disminución de PCO_2 de la sangre, produce un descenso de la sensibilidad de los centros respiratorios bulbares frente al mismo CO_2 . Este fenómeno tiene importancia en la hiperventilación con O_2 puro, como es el caso, por ejemplo, en la oxigenoterapia. Los centros respiratorios bulbares requerirán, al suspender la oxigenoterapia, niveles de CO_2 considerablemente más altos que los normales para ser estimulados. Puede producirse, en este caso, una paralización respiratoria (apnea), que puede conducir a consecuencias fatales.

1.2.2.2. Mecanismos cardiovasculares

La respuesta del corazón en hipoxia, también es de vital importancia para lograr una aclimatación adecuada para las personas que se enfrentan a este tipo de condición.

La respuesta cardiovascular compensatoria en situaciones de hipoxia, comienza por una estimulación de quimiorreceptores periféricos, los cuales generan una respuesta simpática por el aumento de catecolaminas, especialmente norepinefrina (Gallagher & Hackett, 2004). Se produce por tanto, un aumento de la frecuencia cardiaca como también de la fuerza de contracción, además de un incremento del volumen de eyección y del tono vascular periférico, lo cual provoca el aumento del gasto cardíaco (Hackett & Roach, 1987; Schoene *et al.*, 1988).

Este aumento del gasto cardíaco involucra también un mayor consumo de oxígeno por parte del miocardio, el cual a través de reflejos neurohumorales, genera también una respuesta adaptativa a través de la vasodilatación coronaria y del aumento de la presión arterial diastólica.

En el caso de los diferentes órganos del cuerpo, el sistema cardiovascular a través del control neurohumoral, realiza una derivación sanguínea basada en la función que realiza el órgano y su vital importancia en hipoxia. Así, en el cerebro existe un aumento del flujo sanguíneo, producto de la menor resistencia vascular producida por la hipoxia. Esta misma situación se repite en el diafragma, sobre todo si enfrenta resistencias respiratorias aumentadas. Sin embargo en el caso de la circulación pulmonar es

diferente. La hipoxia en los alveolos produce una resistencia vascular pulmonar, provocada por los vasos capilares del pulmón quienes utilizan este mecanismo para redistribuir de manera selectiva el flujo sanguíneo a las zonas mejor ventiladas.

En relación a la duración de la exposición hipóxica, el aumento del gasto cardiaco observado en los primeros estadios de exposición, hace complejo mantener una frecuencia cardiaca elevada por mucho tiempo. Después de los días, durante el periodo de aclimatación, disminuye la sensibilidad de las catecolaminas, aunque aumenta el volumen sistólico, lo cual hace que la función cardiovascular retorne de manera progresiva a valores normales. Además a largo plazo, se produce un aumento del número de capilares inducido por la adaptación a la hipoxia, lo que provoca una disminución de la resistencia vascular periférica logrando una mejor difusión de oxígeno en las fibras (León-Velarde *et al.*, 1993; Panisello *et al.*, 2007). Sin embargo, la hipertensión pulmonar puede persistir por varios días o incluso por años, ya que ha sido descrita su prevalencia en residentes permanentes en altura, llegando a variar entre un 5% y 10% (León-Velarde *et al.*, 2005), lo cual la transforma en un mecanismo fisiopatológico en el caso de las enfermedades provocadas por hipoxia, pudiendo llegar a tener consecuencias fatales para el ser humano (Maggiorini, 2003)

1.2.2.3. Mecanismos hematológicos

Uno de los mecanismos más observados en el cambio del organismo ante la hipoxia es el aumento de la población de eritrocitos debido al aumento en la producción de eritropoyetina (Casas *et al.*, 2000; Farias *et al.*, 2006), principalmente en las células del tubo proximal del riñón. Este aumento eritrocitario permite que la concentración de hemoglobina se incremente y con ello la capacidad de transporte de oxígeno (León-Velarde *et al.*, 2000). Sin embargo, esta medida es solo compensatoria, porque si bien cada eritrocito transporta menor cantidad de oxígeno en hipoxia, el aumento en el número de estas células permite disminuir el déficit total de transporte en la sangre. Aun así, es importante tener en cuenta que el excesivo aumento de la hemoglobina es considerada una patología con un diagnóstico de mal agudo de montaña, el cual comprende una serie de desregulaciones del organismo, asociados principalmente a personas que viven o se exponen a altas alturas por un periodo de tiempo determinado.

Aunque es conocido que bajo condiciones de hipoxia crónica la policitemia generada puede acarrear múltiples implicaciones negativas en la vida de los seres humanos (Monge & León-Velarde, 2003), uno de los factores que hay que tener en cuenta cuando nos enfrentamos a condiciones hipóxicas son los cambios en la viscosidad de la sangre. Así, mientras algunos estudios han mostrado que bajo condiciones hipóxicas se generan cambios significativos en la viscosidad de la sangre (Guyton *et al.*, 1973), en nuestro laboratorio hemos observado que estos cambios son leves y transitorios (Esteva *et al.*, 2009a), por lo que no incidiría directamente en el transporte de oxígeno. Sabemos que la sangre se comporta como un fluido no-newtoniano, determinada por las cualidades físicas durante el flujo que a su vez dependen en gran medida de la cantidad y características de los elementos formes que se encuentran en ella. Así, es muy importante prestar atención a los diferentes parámetros y condiciones sujetas a los distintos tipos de exposición, además de las características propias de los sujetos que se someten a este tipo de condición, ya que por norma general sabemos que el aumento de hemoglobina se ve potenciado por la reducción del volumen plasmático (Heinicke *et al.*, 2003), pero este hecho es revertido con el pasar del tiempo, en donde el cuerpo se aclimata dejando de disminuir el volumen plasmático aunque la cantidad de eritrocitos siga aumentada.

1.3. Tipos de hipoxia

1.3.1. Clasificación según sus causas

Cuando hablamos de hipoxia, es muy importante saber cuáles son los factores que generan esta disminución del suministro de oxígeno en nuestro cuerpo, por lo cual nos permite clasificarla en:

Hipóxica:

Se produce cuando hay una alteración de las fases de ventilación alveolar, generando un déficit en la difusión del oxígeno a nivel alvéolo-capilar. Se produce una deficiente entrega de oxígeno atmosférico a la sangre de los capilares. Puede producirse debido a múltiples enfermedades respiratorias como EPOC, asma, neumonía, enfisema, etc.

Isquémica:

Se produce cuando hay una carencia parcial o total del suministro de oxígeno, producto de una falta de irrigación sanguínea en los tejidos del cuerpo. Las causas se basan tanto en motivos fisiopatológicos como quirúrgicos, como por ejemplo, la exposición extrema a bajas temperaturas, insuficiencia cardíaca, accidente cerebrovascular o trasplante de órganos.

Hipémica:

Es producida por la reducción de la capacidad de transporte de oxígeno en la sangre. Los factores que la producen pueden estar asociados a causas anémicas (disminución de eritrocitos o déficit de hierro), alteraciones de la hemoglobina contenida en los eritrocitos (provocado por productos químicos como el nitrito o el monóxido de carbono) o incluso a causa de una hemorragia.

Histotóxica:

En este tipo de hipoxia son las células quienes no pueden utilizar el oxígeno que se les suministra a través del torrente sanguíneo. Sus causas están asociadas con el abuso del alcohol y drogas, así como también con productos venenosos como el cianuro. Este último afecta directamente al citocromo, impidiendo la realización de la respiración celular.

Hipoxémica:

Este tipo de hipoxia está relacionada con la disminución de la presión parcial de oxígeno en sangre. La disminución de la presión parcial de oxígeno puede estar dada tanto por factores ambientales como por condiciones artificiales, pudiendo clasificar este tipo de hipoxia en dos subtipos:

- **Hipobárica:**

Se produce cuando hay una disminución de la presión atmosférica, produciéndose una falta de captación de oxígeno por parte del organismo, aunque el porcentaje de éste en el aire sigue siendo el mismo. Esta condición se produce debido a que la presión parcial de oxígeno en la atmósfera ($pO_2 = P_{at} \cdot \%O_2$) se ve disminuida, provocando que la diferencia de presión entre el alveolo y la sangre venosa disminuya y como consecuencia disminuye también la presión arterial oxígeno en la sangre arterial.

- **Normobárica:**

Se produce al respirar aire con baja concentración de oxígeno.

1.3.2. Clasificaciones de tipos de exposición

El tiempo al cual sometemos a nuestro organismo a este tipo de exposición es muy importante para entender los efectos que puede tener en nuestro organismo, por lo tanto, también es necesario establecer una clasificación que incorpore las siguientes variantes:

Aguda: Tipo de exposición que es realizada por periodos cortos de tiempo, que pueden ir de horas hasta días. Este tipo de exposición es características de turistas o alpinistas en ascensos breves a la montaña.

Crónica: Tipo de exposición que se realiza por periodos largos de tiempo, comprendiendo años de exposición. Principalmente se asocia a personas que viven en altura ya sea porque por razones de trabajo o porque nacieron en ciudades bajo estas características.

Intermitente:

- **Episódica:** Hipoxia breve que a menudo pasa inadvertida (Samuels, 2004; Muhm *et al.*, 2007; Almendros *et al.*, 2010)

- **Periódica:** Hipoxia de duración larga (horas o días) y que depende del trabajo físico realizado (expediciones, ascensos a la montaña) (Rose *et al.*, 1988; Pomidori *et al.*, 2009)
- **Crónica:** Tipo de exposición realizada por personas que no viven permanentemente en condiciones hipóxicas pero si lo hacen por periodos de tiempo determinados, ya sea por razones de trabajo u otras. Estas personas luego de desenvolver su actividad bajan a nivel del mar para descansar, manteniendo esta intermitencia por largos periodos de tiempo (Richalet *et al.*, 2002)

1.4 Hipoxia hipobárica intermitente y sus beneficios

Como ya hemos mencionado, la exposición hipóxica, supone una serie de adaptaciones fisiológicas y mecanismo regulatorios que nuestro organismo debe activar para poder lograr una aclimatación bajo estas condiciones. Muchos de los efectos de la hipoxia han sido considerados negativos desde el punto de vista fisiológico, lo cual tiene serias repercusiones en la calidad de vida de las personas que viven o trabajan en este tipo de condición. Sin embargo, una de las posibles vías de adaptación fisiológica que provee de características beneficiosas para nuestro organismo bajo estas condiciones es la hipoxia Intermitente (*Intermittent Hypoxia* o IH)

La IH ha sido investigada desde hace años por su valor potencial en la pre-aclimatación a condiciones hipóxicas, así como también en la prevención y tratamiento de algunas enfermedades. Muchas de las primeras investigaciones en este campo fueron llevadas a cabo en la Unión Soviética antes que en Europa Occidental y América.

El concepto de entrenamiento hipóxico repetido surgió antes de la Segunda Guerra Mundial debido a la necesidad de aclimatación que requerían los pilotos soviéticos, que volaban en cabinas abiertas a altitudes de 5.000 a 6.000 m (16.000 a 19.700 pies) (Streltsov, 1939).

La búsqueda de métodos eficientes de pre-aclimatación llevó a que Nikolai Sirotinin (1896-1977) se planteara la primera interrogante en la investigación de la hipoxia intermitente en el año 1934, en el Instituto de Fisiología Bogomoletz en Kiev. Aunque Sirotinin no realizó experimentos usando IH, propuso que pocos días de exposición hipóxica haría aumentar la tolerancia del organismo en un condición hipóxica posterior (Sirotinin, 1940, 1963). Luego de estos estudios surgió el concepto de “intermitente”, el cual se basaba en repetidas exposiciones a hipoxia las cuales podrían ser un método eficaz de pre-aclimatación a la altura (Ivashkevich & Serebrovskaya, 2000).

A partir de estos descubrimientos, numerosos los investigadores en todo el mundo se interesaron en esta nueva línea de investigación y sus posibles efectos beneficiosos para nuestro organismo, sin embargo en 1999, las investigaciones relacionadas con la hipoxia intermitente tuvieron un duplicado aumento gracias a la financiación de investigación que se impulsó en el *National Institute of Health* (NIH) en Estados Unidos. Durante el periodo presidencial de Bill Clinton, el *National Heart, Lung, and Blood Institute* de Estados Unidos, creó un fondo para financiar investigaciones bajo el concepto de “*Oxyge Sensing During Intermittent Hypoxia*”, con el objetivo de comprender como la hipoxia intermitente contribuye y afecta a la patofisiología cardiopulmonar, vascular, hematológica y desórdenes del sueño, lo cual significó una sustancial influencia en la productividad y calidad científica en esta área (Xi & Serebrovskaya, 2009).

Además a partir del año 2000, comienza a funcionar la nueva revista llamada *High Altitude Medicine and Biology*, liderada por su editor jefe, el profesor John B. West de la Universidad de California, San Diego. Todos estos antecedentes generaron un evidente aumento de publicaciones referentes al área de la hipoxia intermitente a partir del año 2000.

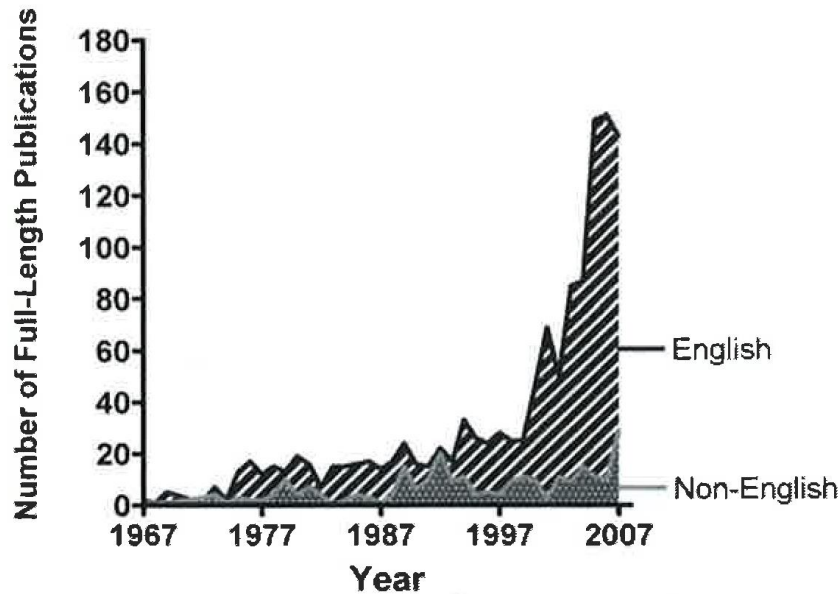


Figura 1. Gráfica que muestra la tendencia de cuarenta años de investigación de hipoxia intermitente en termino de número de publicaciones indexadas en PUBMED bajo la palabra “Intermittent Hypoxia” (Xi & Serebrovskaya, 2009)

También es importante mencionar respecto a este tema que ya sea por razones políticas y socioeconómicas o no, históricamente científicos de Europa del Este han sido los pioneros en descubrir los efectos beneficiosos de la hipoxia intermitente en relación al pre-acondicionamiento del cuerpo contra factores de estrés ambiental y varias enfermedades, mientras que sus pares de Europa Occidental y Norte América fueron los primeros en describir los efectos perjudiciales de la hipoxia intermitente crónica asociada a trastornos respiratorios del sueño. Tal vez si hubo una división cultural en esta área, hoy en día esta tendencia ha cambiado. El uso de nuevas tecnologías y el mundo científico inmerso en un sistema globalizado, ha permitido avanzar sostenidamente en el estudio de los efectos de la hipoxia intermitente en nuestro organismo, pudiendo demostrar científicamente que bajo ciertos parámetros específicos se pueden impulsar varios cambios importantes que ayudan a prevenir y tratar enfermedades, así como también producir mejoras fisiológicas tanto en atletas como en personas que deben trabajar o vivir en altura geográfica.

Basándose en los mecanismos básicos que subyacen a la exposición a IH, como la regulación de la respiración, la producción de radicales libres y la respiración mitocondrial, es que se comenzó a utilizar este estímulo para el tratamiento de la bronquitis obstructiva crónica y asma bronquial (Donenko, 1992; Kulberg, 1997). Su aplicación permitió afirmar que la adaptación del individuo a este tipo de hipoxia provoca una mejora significativa del cuadro clínico o incluso una recuperación completa (Chizhov & Bludov, 2000). Además, la ausencia de efectos secundarios negativos, típicamente observado durante la terapia farmacológica, hacen que el tratamiento de este tipo de enfermedad con IH tenga buenos pronósticos de recuperación, aunque no siempre se ha documentado este tipo de información (Serebrovskaya *et al.*, 2003).

Una de las primeras líneas de investigación basadas en producir posibles beneficios fisiológicos a través de la IH, surgió con la búsqueda de mejoras en la capacidad de trabajo y resistencia de atletas y astronautas (Volkov *et al.*, 1992; Gippenreiter & West, 1996), basados en el aumento tanto de hemoglobina como de hematocrito provocado por esta condición y que por consecuencia incide directamente en transporte de oxígeno y en un aumento potencia aeróbica a nivel del mar (Ekblom *et al.*, 1972; Buick *et al.*, 1980). Los beneficios de la exposición a hipoxia intermitente se comenzaron a comparar con el entrenamiento bajo estas condiciones (*Intermittent Hypoxia Training* o IHT), presentando varios métodos eficientes conocidos en la actualidad, demostrado la importante ayuda que significa para los atletas en la preparación de competencias en la altura (Roels *et al.*, 2007). Es así como IHT ha sido estudiado en diferentes deportes, pudiendo obtener beneficios específicos para cada uno de ellos (Radziewski & Radziewska, 2009).

Además la hipoxia intermitente ha sido ampliamente estudiada y utilizada en la medicina del deporte y montaña, ya sea por las mejoras que muestra en relación a la disponibilidad de oxígeno en los tejidos (Leon-Velarde *et al.*, 2000), como en las adaptaciones de tejido muscular que favorecen el entrenamiento físico en altitud (Hoppeler & Vogt, 2001; Faiss *et al.*, 2013). En relación a los efectos cardiovasculares, la exposición a IH ha sido considerada cardioprotectora, bajo estímulos dependientes del tipo de exposición, en relación a su frecuencia y duración (Milano *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2003; Béguin *et al.*, 2005; Yeung *et al.*, 2007). Mucho de estos efectos cardioprotectores son producidos por la vía inducida Óxido Nítrico Sintasa (iNOS)

(Tekin *et al.*, 2010). La IH ayuda a almacenar Óxido Nítrico (NO) intracelularmente cumpliendo un rol importante en los desórdenes cardiovasculares y la vasoprotección frente al NO en sangre (Manukhina *et al.*, 2011, 2013). Además la adaptación a periodos de hipoxia e hiperoxia es un prometedor enfoque al aumento de adaptación a las señales de ROS, lo cual es importante y efectivo protegiendo las membranas de las estructuras del corazón, cerebro e hígado contra el estrés y la hipoxia (Arkhipenko *et al.*, 2005; Sazontova *et al.*, 2012). También la IH, ha demostrado ser una condición que provee al miocardio una notable tolerancia a la isquemia y reperfusión (Mallet *et al.*, 2006), así como también ser un efectivo inductor de angiogénesis tanto en músculo cardíaco como esquelético (Kayar & Banchemo, 1985; Tekin *et al.*, 2010, 2011).

Los efectos observados sobre el sistema nervioso, han mostrado que el precondicionamiento hipóxico atenúa el daño oxidativo en varios modelos animales con enfermedades neurodegenerativas (Lin *et al.*, 2002), en donde la IH cumple un rol importante induciendo la proliferación de células progenitoras en el área subventricular y giro dentado del hipocampo (Zhu *et al.*, 2005a, 2005b). Estos beneficios podrían ser aplicados al campo de enfermedades neurodegenerativas con buenas perspectivas en la utilización no farmacológica contra enfermedades como el Parkinson (Shihabuddin *et al.*, 1999; Kolesnikova *et al.*, 2003; Kolesnikova & Serebrovskaya, 2009).

La proliferación de células progenitoras relacionadas con IH, no solo se ha estudiado en el sistema nervioso, sino que en múltiples órganos y tejidos del cuerpo. Actualmente sabemos que la respuesta de células progenitoras a la IH corresponde a un mecanismo de adaptación de nuestro cuerpo a las condiciones ambientales (Nikolsky & Serebrovska, 2009). La expresión de progenitores bajo condiciones hipóxicas se ha observado a nivel embrionario (Adelman *et al.*, 1999; Ramírez-Bergeron *et al.*, 2004), hematopoyético (Cipolleschi *et al.*, 1993; Parmar *et al.*, 2007; Viscor *et al.*, 2009) y mesenquimal (Provot & Schipani, 2007; Buravkova *et al.*, 2014; Vanacker *et al.*, 2014). Sabemos que el factor crucial para el funcionamiento y mantención de células progenitoras es la hipoxia, por lo que el impacto hipóxico exógeno adicional conduce a la activación del sistema de proliferación, revelando que la IH con cierta duración e intensidad es un factor que desencadena de forma potente la activación de la transcripción de células progenitoras en comparación con la hipoxia constante (Nikolsky & Serebrovska, 2009).

Todos estos antecedentes anteriormente presentados forman parte de muchas investigaciones que intentan correlacionar los efectos positivos que tiene la exposición a IH en el organismo. La gran variedad de protocolos aplicados bajo el concepto de IH, no siempre permite relacionar unos estudios con otros, sin embargo cada día se avanza por encontrar consensos y efectos positivos que puedan potenciar la IH como una herramienta que aproveche los efectos positivos de la transcripción de señales provocados por la condición hipoxia, sin padecer los efectos negativos de esta misma.

Puntos claves Parte 1

- La hipoxia genera mecanismos de adaptación respiratorios, cardiovasculares y hematológicos regulados por HIF-1.
- El tipo y la duración de la exposición hipoxica son fundamentales para prever los tipos de cambios que se obtendrán tras la exposición.
- Los estudios han demostrado que la hipoxia hipobárica intermitente proporciona mejores mecanismos de adaptación del organismo frente a este tipo de exposición.
- Estudios recientes han demostrado que la hipoxia afecta al flujo sanguíneo y también puede tener efectos directos en la proliferación de células madre.

Parte 2: Hemorreología

1.5. Definición

La hemorreología es la ciencia que estudia el comportamiento del flujo y la deformación de los elementos celulares de la sangre. La adecuación del flujo de sangre para satisfacer las demandas metabólicas a través de los vasos sanguíneos, depende de muchos factores, dentro de los que se encuentran las condiciones ambientales (disponibilidad de oxígeno) y diferentes condiciones metabólicas que afectan directamente al transporte de oxígeno a los tejidos. Sin embargo, el grado en que las propiedades reológicas de la sangre contribuyen a la resistencia del flujo vascular, particularmente en la microcirculación, están determinadas por factores de resistencia del vaso sanguíneo y propiedades hemorreológicas locales, como la viscosidad de la sangre, deformabilidad de los eritrocitos, y la agregación de eritrocitos (Baskurt & Meiselman, 2003; Hamlin & Benedik, 2014).

1.5.1. La sangre

La sangre es un tejido conectivo líquido que está compuesto por plasma y los elementos formes. El volumen de sangre de una persona, se conoce como volemia, estimándose los valores normales aproximadamente entre un 7% y 8% del peso corporal, equivalente aproximadamente a 75cc kg^{-1} . Aunque su densidad es levemente superior a la del agua ($1,05 - 1,06 \text{ kg L}^{-1}$), su viscosidad es mayor debido principalmente a los elementos formes o figurados que forman parte de ella. Estos elementos formes constituyen un 45% del volumen sanguíneo, y se conocen con el nombre de hematocrito. El plasma sanguíneo compone el 55% restante y este a su vez está compuesto aproximadamente de un 92% de agua y un 8% de proteínas.

1.5.2. El plasma

El plasma es un fluido traslúcido y amarillento que representa la matriz extracelular líquida en la que están suspendidos los elementos formes. Se compone de una mezcla compleja entre solutos inorgánicos como Na^+ , Ca^{++} , K^+ , HCO_3 , entre otros, y solutos orgánicos como glucosa, aminoácidos, enzimas, hormonas, proteínas plasmáticas, etc.

Este líquido ligeramente alcalino con un pH de 7.4, contiene varios tipos de proteínas que se pueden clasificar en tres grupos principalmente:

- Albúminas: que regulan el contenido de agua dentro de la célula y en los líquidos intercelulares
- Globulinas: que su porción gamma es rica en anticuerpos y forma parte de determinadas respuestas infecciosas de nuestro organismo
- Fibrinógeno, que cumple una función principal en los procesos de coagulación

La presencia de estas proteínas hace que la viscosidad del plasma sea 1,5 veces la del agua, sin embargo, las proteínas del plasma y la hemoglobina de los glóbulos rojos son importantes amortiguadores ácido-básicos que mantienen el pH de la sangre y de las células corporales dentro de una pequeña variación.

Además, la viscosidad plasmática puede ser regulada a través del control de la expresión de las proteínas que las componen (Esteva *et al.*, 2009a), pudiendo cumplir una función muy importante en el mantenimiento de la viscosidad sanguínea bajo diferentes condiciones ambientales.

1.5.3. Elementos formes

Los elementos formes o figurados de la sangre están compuesto por los eritrocitos, leucocitos (granulares y no granulares) y las plaquetas.

Aunque los eritrocitos forman el 99% de los elementos formes, todos ellos cumple funciones importantes en la homeostasis de nuestro organismo.

Los eritrocitos tienen un diámetro aproximado de 7 – 8 μm y tienen la capacidad de deformarse al atravesar vasos sanguíneos de menor diámetro. Su función principal es el transporte de hemoglobina que a su vez lleva oxígeno de los pulmones a los diferentes tejidos del cuerpo, concentrando hasta 34 g de hemoglobina. Luego, una vez en los tejidos y gracias a que contienen anhidrasa carbónica, transportan CO_2 en forma de HCO_3^- de vuelta a los pulmones, para ser eliminado del cuerpo.

Los leucocitos, son células que realizan su función principal fuera del torrente sanguíneo, destruyendo agentes invasores mediante fagocitosis y formando anticuerpos como respuesta inmunológica. Pueden ser caracterizadas gracias a su morfología celular en granuladas (polimorfo nucleares) y agranuladas.

Dentro de las granuladas, se encuentran los neutrófilos. Su cantidad total es de alrededor de un 60% de los leucocitos y su función más importante es la de fagocitar. Además poseen agentes bactericidas y tienen una función importante en las inflamaciones.

Los eosinófilos, constituyen el 2% de los leucocitos y tienen una función fagocítica débil y aumentan en procesos alérgicos y parasitosis. Así también los basófilos que constituyen cerca del 0,5% de los leucocitos totales, liberan histamina y serotonina además de participar en los procesos de inflamación.

Los leucocitos no granuladas están compuestos por los linfocitos y los monocitos. Los linfocitos comprenden entre el 20% y 50% del total de leucocitos sanguíneos. Son importantes en la respuesta inmunitaria y son los principales responsables del control de las infecciones. Pueden ser clasificados en T y B.

Los monocitos conforman entre el 2% al 8% de los leucocitos sanguíneos y sirven como precursores de los macrófagos además de participar en las respuestas inflamatorias.

Por último, las plaquetas o también conocidas como trombocitos, conforman el tercer elemento de la sangre. Estas se derivan de los megacariocitos y son importantes en la hemostasia. Su función radica en que se adhieren a la superficie interna de la pared del vaso que presenta el problema y gracias a que posee grandes cantidades de fosfolípidos, estos actúan como receptores para colágeno y fibrinógeno.

1.5.4. Reología

La palabra reología, que proviene del griego ρειν que significa fluir, fue introducida al mundo de la ciencia por Eugene Bingham en 1929. Esta disciplina científica se ocupa del flujo y la deformación de materiales sometidos a la acción de fuerzas mecánicas.

La reología es una parte de la mecánica de medios continuos y presentan propiedades que pueden ser medidas a través de reómetros, que son instrumentos que someten al material a diferentes tipos de deformaciones controladas y así medir los esfuerzos que expresan sus estructuras.

La reología sanguínea o hemorreología, estudia la circulación sanguínea y las características físicas que influyen en sus propiedades, en la de sus componentes y los vasos sanguíneos (Scott-Blair, 1969; Dintenfass, 1971)

Como fluido entendemos toda materia que es capaz de deformarse cuando se somete a una fuerza o deformación. Sabemos que la sangre presenta estas características observando que es un líquido heterogéneo y complejo que contiene solutos orgánicos, solutos inorgánicos y células que forman parte del fluido sanguíneo. Cada una de los elementos que la componen determina las propiedades reológicas de la sangre siendo determinante el número de células, su morfología, su agregación, su rigidez y la naturaleza del plasma, todos estos determinantes en el comportamiento fisiopatológico de la circulación sanguínea.

Aunque en el pasado las propiedades de la sangre fueron subestimadas, hoy en día presentan una interesante línea de investigación al relacionarla con fisiopatologías cardiovasculares, pudiendo ser un importante instrumento predictivo de muchas enfermedades y afecciones circulatorias. Las principales características de ser evaluadas en sangre son: los parámetros de viscoelasticidad sanguínea; viscosidad plasmática; deformabilidad y agregación eritrocitaria.

1.5.5. Viscosidad

El concepto de viscosidad nació con Newton el año 1687, cuando en su obra “Philosophiae Naturalis. Principia Mathematica.” afirmó que la resistencia ejercida y que surge a partir de una falta en el deslizamiento de un fluido, si el resto de factores se mantienen, es proporcional a la velocidad a la que las partes de este fluido son separadas entre sí (Facultad de Biotecnología y Biología Celular, n.d.).

El modelo de Newton se puede explicar en la figura 2, en donde se muestra dos superficies A, separadas por una distancia H, sometidos a una fuerza F que le provoca una velocidad V.

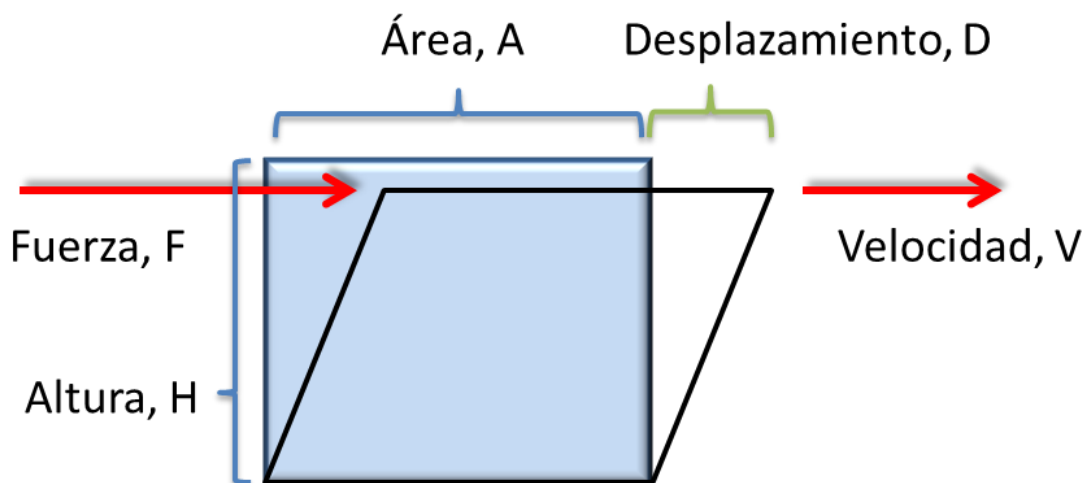


Figura 2. Esquematización del modelo de Newton para viscosidad.

Para comprender mejor esta ley es necesario considerar un líquido dividido en estratos paralelos e infinitesimales de superficies A (figura 3), separado por una distancia H sometidos a una fuerza F . Al tiempo $t=0$ a la lámina superior se le imprime un movimiento de dirección “ x ” con una velocidad constante V . Las capas del fluido en contacto con la superficie propagan el movimiento en dirección “ x ” a las capas inferiores en la dirección “ y ” generándose un desplazamiento D , por lo tanto, se transfiere cantidad de movimiento de dirección “ x ” a la dirección “ y ”, lo cual se denomina tensión de corte (τ).

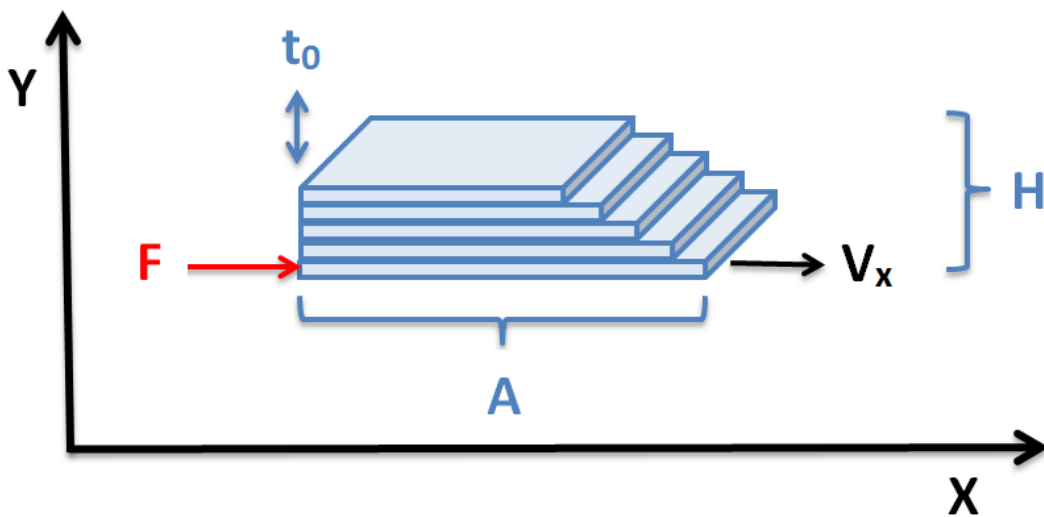


Figura 3. Modelo de Newton basado en estratos paralelos e infinitesimales de superficies

A mayor τ el perfil de velocidad se va modificando, hasta alcanzar un estado estacionario, basado en un flujo laminar. Por lo tanto, todo fluido que presente una viscosidad constante en el tiempo para cualquier esfuerzo o cizalla contra la velocidad de deformación, cumple con esta ley y es llamado “Fluido Newtoniano” y representa su viscosidad con la letra μ (mi).

Matemáticamente puede ser explicado a través de la ecuación representada en la figura 4, en donde τ es el tensión tangencial o tensión de corte (*shear stress*), el cual representa la fuerza tangencial aplicada por unidad de superficie; d_v/d_H es el gradiente de velocidad ($\dot{\gamma}$), el cual representa el quociente entre la velocidad y la distancia entre las capas contiguas de líquido (*shear rate*); y μ la viscosidad del fluido.

$$\tau = \mu \frac{d_v}{d_H}$$

Figura 4: Modelo matemático de la hipótesis de Newton

Entonces la viscosidad de un fluido newtoniano puede ser determinada por la relación entre la tensión tangencial y el gradiente de velocidad (Figura 5).

$$\mu = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$$

Figura 5. Comportamiento reológico de un fluido newtoniano

Basado en lo descrito por newton (figura 2) podemos entender las principales medidas utilizadas en el estudio de la viscosidad de los fluidos (figura 6)

$$\text{Shear Stress} = \tau = \frac{F}{A}$$

(Tensión de corte)

$$\text{Shear Strain} = \gamma = \frac{D}{H}$$

(Deformación de corte)

$$\text{Shear Rate} = \dot{\gamma} = \frac{V}{H}$$

(Gradiente de velocidad)

Figura 6. Ecuaciones de los principales factores implícitos en el estudio de la viscosidad de fluidos. Siendo A el área de sección transversal en donde se aplica la fuerza; H la distancia entre las capas del fluido; F la fuerza aplicada; V la velocidad constante a la cual es sometido el fluido; D el desplazamiento que se genera.

Además es importante considerar que un líquido que fluye a través de un tubo cilíndrico, se le puede considerar formado por capas concéntricas. La μ y el $\dot{\gamma}$ varían de acuerdo a lo cercano que estén estas capas en relación a las paredes de ese tubo (figura 7), por lo que la velocidad del flujo dependerá directamente de estos dos factores.

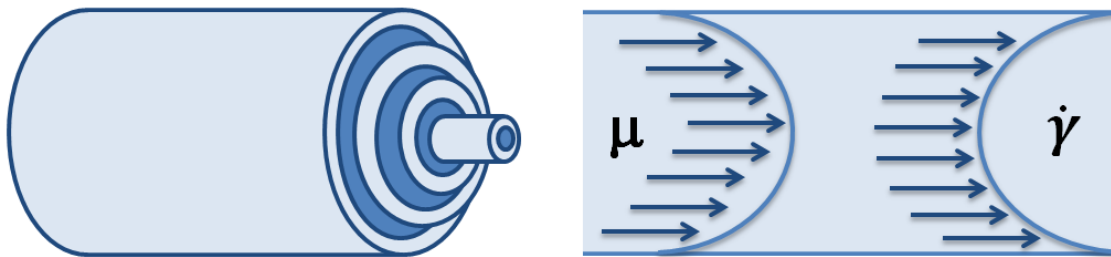


Figura 7. Capas concéntricas de un líquido que fluye en un tubo y las diferencias de viscosidad y gradiente de velocidad que se experimenta dentro de este.

Existen también fluidos que no cumplen con esta ley, los cuales son aquellos llamados no Newtonianos. Estos fluidos una relación entre la tensión tangencial y el gradiente de velocidad que no es constante. Un ejemplo de ello son los fluidos biológicos (como la sangre), que por su composición contienen macromoléculas disueltas en ellos, las cual inciden directamente en el comportamiento viscoso de estos fluidos. El hecho que estos líquidos no posean una viscosidad característica, necesariamente deben ser estudiados bajo parámetros y condiciones específicas.

Para estos fluidos no newtonianos se representa su viscosidad aparente con la letra griega η (eta) y forman el objetivo principal de la reología.

La figura 6 nos muestra diferentes comportamientos reológicos de los fluidos no newtonianos los cuales dan cuenta de las diferentes variables de η .

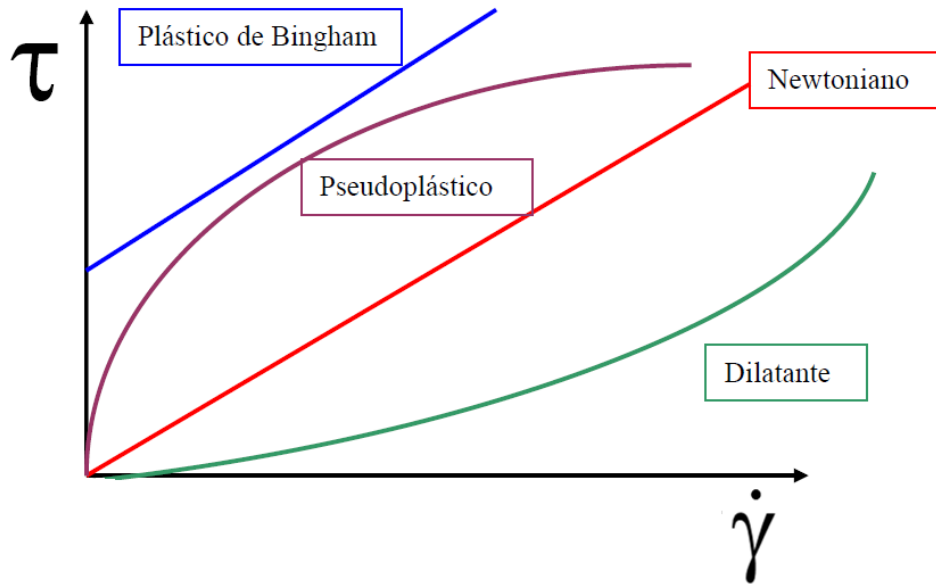


Figura 8. Gráfica que muestra el comportamiento reológicos de fluidos no newtonianos en relación a tensión de corte y al gradiente de velocidad (Facultad de Biotecnología y Biología Celular, n.d.)

Los fluidos definidos como “Plásticos de Bingham”, son aquellos en que es necesario superar un determinado umbral de esfuerzo para que el sistema comience a fluir. El fluido “pseudoplástico” (*Shear thinning*), es aquel en donde la η disminuye al aumentar $\dot{\gamma}$, inverso a lo que sucede con los fluidos “dilatantes” (*Shear thickening*), en donde aumenta el η al aumentar $\dot{\gamma}$. Además otra clasificación de estos fluidos puede formularse cuando la viscosidad aparente disminuye con el tiempo, la cual llamamos fluidos tixotrópico. En el caso contrario, es decir, que la η aumente con el tiempo, el fluido es llamado reopéctico.

Tanto para η como para μ la unidad de medida de la viscosidad en el Sistema Internacional de Unidades (SI) es:

$$[\text{Pa}\cdot\text{s}] = [\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}]$$

Aunque en el sistema cegesimal (CGS) la unidad de medida que tiene mayor difusión es el Poise (P), nombre que se le asignó en honor al médico francés Jean-Louis-Marie Poiseuille (1799-1869), la que corresponden físicamente a la fuerza desarrollada por 1 dina sobre una superficie de 1 cm² a una velocidad de 1 cm por segundo. Así también suele utilizarse en este sistema el prefijo centi: centipoise (cP).

La relación entre ambas unidades es:

$$1 \text{ mPa}\cdot\text{s} = 1 \text{ cP}$$

1.5.6. Viscoelasticidad de la sangre

Aunque sabemos que el comportamiento reológico sanguíneo responde a un modelo no-newtoniano del tipo pseudoplástico (Prothero & Burton, 1961), y a gradientes de velocidad bajos, presenta características tixotrópicas (Huang *et al.*, 1975), la sangre es un fluido complejo cuyas propiedades reológicas deben ser estudiadas bajo parámetros diferentes.

En un principio se estudiaban bajo el supuesto que la viscosidad controlaba las propiedades del flujo (Lowe, 1988), sin embargo, no es un fluido común, ya que se ve principalmente afectada por la suspensión de células por un proceso de fluidización elástica.

Como ya hemos visto el método más común para determinar la viscosidad de un fluido es la relación entre tensión de corte y el gradiente de velocidad de este, sin embargo en el caso de la sangre, el flujo se ve fuertemente afectado por la viscosidad del plasma, la deformabilidad y agregación de los eritrocitos y el hematocrito. El plasma sanguíneo normalmente solo muestra la viscosidad (Lowe & Barbenel, 1988), mientras que la sangre entera muestra tanto un comportamiento viscoso como elástico, pudiendo denominarse como un líquido viscoelástico (figura 9).

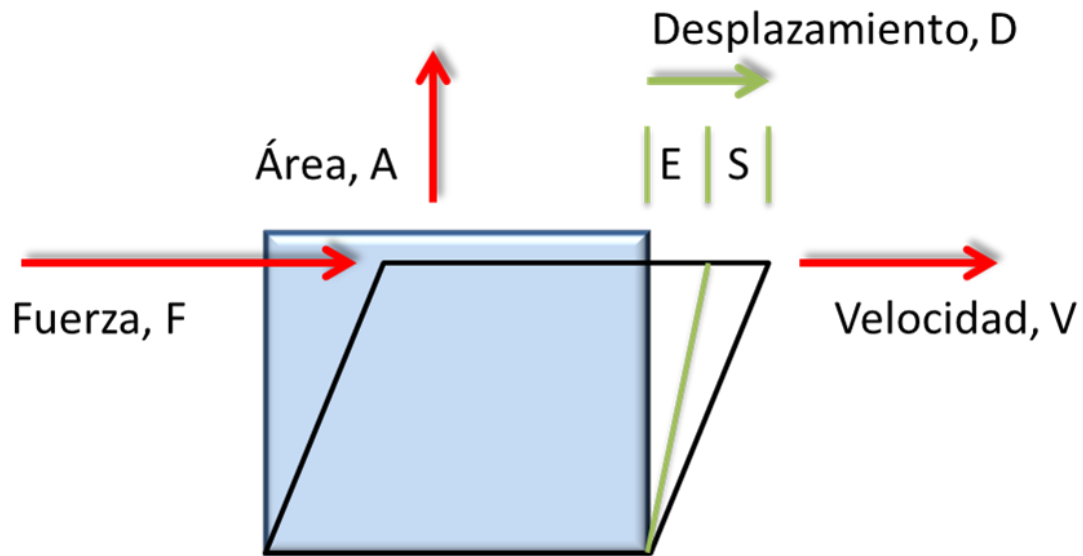


Figura 9. Diagrama que muestra un volumen cúbico de sangre en cizalla. El desplazamiento D debido a la deformación se compone de dos partes: una parte elástica E y una parte deslizante S . Con una fuerza constante F , E permanece constante pero S continua aumentando. Cuando la fuerza se retira, E disminuye a cero mientras S se mantiene sin cambios.

La viscoelasticidad es un parámetro reológico que describe las propiedades de fluidos complejos como la sangre y como parte de su descripción, contempla la viscosidad y la elasticidad del líquido estudiado (Vilastic Scientific, 2010).

G.B. Thurston en 1972, fue el primer científico que midió las propiedades viscoelásticas que influyen en el flujo pulsátil de la sangre (Thurston, 1972). La viscoelasticidad de la sangre es principalmente responsabilidad de los eritrocitos que ocupan aproximadamente la mitad de su volumen. En relación a ella, la viscosidad se relaciona con la energía disipada durante el flujo principalmente debido al deslizamiento y la deformación de los eritrocitos, mientras que la elasticidad se relaciona con la energía que almacenan de estas mismas células, debido a la orientación y la deformación a la cual son sometidas durante el flujo.

Entendiendo que el flujo circulatorio sanguíneo es pulsátil (Thurston, 1972, 1979), en cada latido que el corazón realiza, bombea energía a la sangre, la cual a su vez se disipa (viscosidad) y se almacena (elasticidad) durante el flujo. Los eritrocitos juegan un papel dominante en la viscoelasticidad arterial y su respuesta al flujo pulsátil.

Para comprender mejor esta cinética Thurston propone dividir el perfil viscoelástico de la sangre humana en tres regiones: Región A, referida a bajo gradiente de velocidad, Región B, referida a un gradiente de velocidad medio y la Región C, que comprende altas gradientes de velocidad de corte.

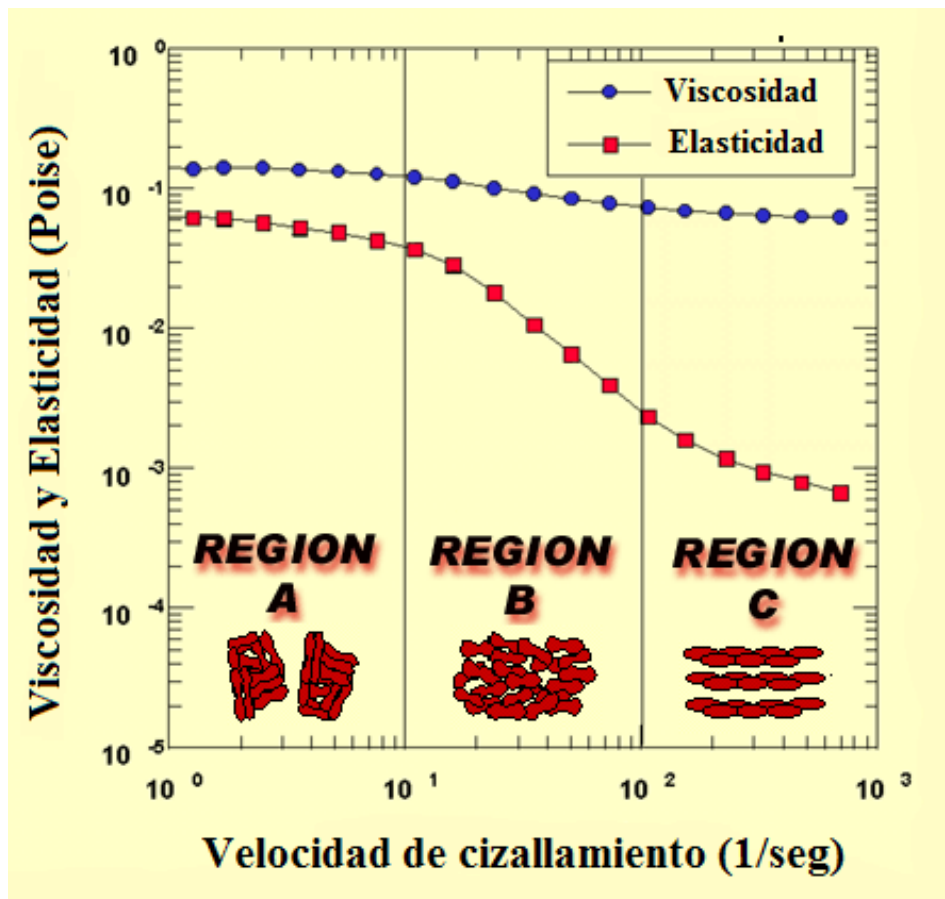


Figura 10. Gráfica que demuestra la relación que hace Thurston del comportamiento viscoelástico de la sangre según la región en que se encuentra el fluido (Vilastic Scientific, 2010)

En reposo los eritrocitos tienden a agregarse y apilarse juntos debido a la carga intrínseca que posee (Región A). Una vez que el gradiente de velocidad comienza a aumentar el tamaño de los agregados disminuye posibilitando una mayor libertad de movimiento interno en el fluido (Región B). Una vez que el fluido se somete a una tensión mayor, las fuerzas que agregaban a los eritrocitos también los deforman y orientan según el flujo, formando capas (Thurston, 1989) que se deslizan entre capas de plasma, generando un componente elástico (Región C). Importante es mencionar que los eritrocitos nunca entran en contacto con la pared endotelial de los vasos ya que existe una capa de plasma llamada “membrana plasmática” que actúa como lubricante entre ellos.

La viscoelasticidad de la sangre en rangos normales varía muy poco, por lo que cualquier cambio evidente supone alguna enfermedad o alteración en sus componentes internos, siendo la agregabilidad (Chien *et al.*, 1970; Rampling, 1988) y la deformabilidad (Dormandy, 1988; Stuart, 1988) factores claves para la conservación del fluido viscoelástico.

Debido a este comportamiento reológico de la sangre, el sistema vascular se verá sometido a diversas condiciones de flujo oscilante en donde factores no vasculares y vasculares incidirán de forma directa sobre estos comportamientos hemodinámicos de la sangre.

1.5.7. Factores hemorreológicos

El cambio que se observa en la sangre, tanto a bajas tasas de corte (plástico) y con tasas mayores (dilatante-tixotrópico), denota el complejo comportamiento que condiciona su fluídica, tanto por el medio interno que la compone, como por el medio por el que fluye. Así se pueden distinguir factores vasculares y no vasculares que inciden en su comportamiento.

1.5.7.1. Factores vasculares

En condiciones de flujo laminar, sabemos que los eritrocitos tienden a concentrarse en el eje central del vaso, quedando la zona más cercana al endotelio prácticamente son células. Este efecto llamado *plasma skimming* (Moggi, 2011) es responsable de que las ramas colaterales de una arteria, que reciben sangre prácticamente del borde del vaso principal, sea más escasa en eritrocitos (Krogh *et al.*, 1922; Chien *et al.*, 1975).

Estos factores vasculares se relacionan con el estudio del patólogo sueco Robin Fåhræus (1888-1968), quien realizó estudios pioneros en reología sanguínea describiendo dos efectos reológicos que llevan su nombre. El efecto Fåhræus está basado en un flujo laminar, descubriendo que si se hace circular sangre por un tubo, la cual proveniente de un reservorio, la concentración de eritrocitos es menor en el tubo que en el reservorio (Chien *et al.*, 1975). Así pudo deducir que los eritrocitos se desplazan más rápido que el plasma y su concentración en los vasos es menor a su concentración en los grandes vasos de la circulación sistémica.

Además pudo observar que en vasos pequeños, el plasma ocupa más espacio que el Hc que hay en él, con lo cual el flujo sanguíneo se ve aumentado, disminuyendo su viscosidad aparente (Gelin, 1961). Este efecto llamado Fåhræus-Lindqvist o también conocido como “Efecto Sigma”, complementa aún más el estudio de factores microrreológicos en sangre, ya que ley de Poiseulle que establece una viscosidad aparente constante para la sangre en tubos superiores a 1mm de diámetro, no contemplaba esta disminución no lineal a la cual se ve afectada en tubos de diámetro inferior a 300 μm .

Debido a las diferencias que existen entre los diferentes diámetros de los vasos sanguíneos, podemos comparar el diámetro de los vasos sanguíneos en relación con el diámetro del eritrocito y diagramar en tres grandes áreas este sistema:

- **Circulación sistémica:** Corresponde a arterias y venas de un diámetro 50 veces superior a la de un eritrocito. La velocidad del flujo es alta, se observa un flujo laminar con características tixotrópicas en su viscosidad.
- **Microcirculación:** Correspondiente a arteriolas y vénulas de un diámetro entre 1 y 50 veces el eritrocito. En estos vasos aumenta la capa de plasma marginal y la sangre presenta un comportamiento pseudoplástico.
- **Circulación capilar:** Vasos de menor diámetro que un eritrocito. Mientras el eritrocito tiene aproximadamente 7,3 μm de diámetro, estos vasos pueden llegar a tener 3 μm . Por lo tanto los eritrocitos deben deformarse para poder pasar, produciéndose un efecto de amasado en la membrana de este. Así en su interior la hemoglobina oxigenada y desoxigenada se mezclan favoreciendo el intercambio de oxígeno con el medio.

Las propiedades mecánicas de los vasos, también afectan al desplazamiento de la sangre. Los vasos no son cilíndricos y sus paredes son en parte elásticas y no rígidas, por lo que pueden ser modificadas por el movimiento (Bateman *et al.*, 2003). Respecto a los vasos, cuando estos disminuyen su diámetro, se produce un fenómeno llamado “inversión” el cual se caracteriza por un aumento de la viscosidad aparente de la sangre, siendo un factor clave en la circulación la tonicidad del plasma, la temperatura y los eritrocitos (Johnson, 1971; Lipowsky *et al.*, 1980).

Por último y debido a que la sangre pasa por distintos comportamientos reológicos en la circulación, es conveniente utilizar el número adimensional de Reynolds para relacionar la densidad, viscosidad, velocidad y dimensión típica de un fluido, para poder establecer el flujo es laminar (número pequeño) o si es turbulento (número mayor). En el caso de la sangre los valores son ejemplificados en la figura 11.

$$\text{Re} = \frac{\text{velocidad del fluido} \times \text{calibre de los vasos}}{\text{viscosidad del fluido}}$$

Re > 50000 flujo turbulento

Re ≈ 2300-50000 transición

Re < 2300 flujo laminar

Figura 11. Número de Reynolds y valores representativos para el flujo sanguíneo (Moggi, 2011)

1.5.7.2. Factores no vasculares

Los factores no vasculares inciden de manera directa en el comportamiento reológico de la sangre. Como ya hemos mencionado el comportamiento viscoso de la sangre está determinado por la viscosidad plasmática, por la concentración celular de ella (hematocrito) y por la deformación y agregación de eritrocitos (Popel & Johnson, 2005).

El plasma sanguíneo presenta un comportamiento viscoso correspondiente al tipo newtoniano. Su viscosidad que es 80% superior a la del agua a 37°C, está determinada por las proteínas plasmáticas, las cuales incluyen la albumina, las globulinas y el fibrinógeno (Merrill *et al.*, 1963; Matsuda & Murakami, 1976; Bishop *et al.*, 2001)

La albumina es la más abundante en el plasma, representando más del 50% del total de proteínas, es de tamaño pequeño y tiene poca influencia en la viscosidad. Las globulinas abarcan cerca del 40% de las proteínas plasmáticas y tienen un tamaño mayor que influyen proporcionalmente a la viscosidad plasmática. Sin embargo el fibrinógeno que representa cerca del 5% del total de proteínas es el principal responsable de la viscosidad plasmática, debido a su peso (400 kDa) y forma alargada. También, este último, es determinante en la agregación eritrocitaria siendo superior su importancia hemorreológica que la de otras proteínas (Mchedlishvili, 1998).

Un efecto a considerar en relación a la viscosidad del plasma es la temperatura a la cual esté el flujo sanguíneo, ya que esta variará la viscosidad cerca de 2% por grado (Moggi, 2011), entendiéndose que hay zonas del cuerpo como el cerebro, en donde la temperatura es más elevada que otras.

El hematocrito representa la concentración celular de la sangre y por ende es el principal factor determinante de la viscosidad sanguínea. En 1918 se demostró la relación que existe entre el hematocrito y el volumen corpuscular de los eritrocitos que lo componen (Trevan, 1918). Así, en 1971 Chien y colaboradores demostraron de forma fisiomatemáticamente la influencia que ejercía el hematocrito frente a la viscosidad sanguínea (Chien *et al.*, 1971). Estos estudios dieron cuenta las alteraciones hidrodinámicas que producían los eritrocitos sobre el flujo sanguíneo, al sumar además el volumen que ocupa el plasma alrededor estas células, comportándose como una extensión rígida de las mismas y aumentando aún más el hematocrito aparente.

Sin lugar a dudas el componente más importante del hematocrito lo forman los eritrocitos, ya que los efectos de las plaquetas y leucocitos se consideran de poca relevancia debido a su menor número relativo (Merrill *et al.*, 1969). Los eritrocitos debido a su capacidad de deformación y agregación influyen de manera preponderante en la viscosidad sanguínea. La deformabilidad intrínseca del eritrocito es la suma de diversos factores, tales como la membrana celular, el estado metabólico de la célula, su viscosidad interna y el estado fisicoquímico de la Hb que hay presente dentro del eritrocito. Todas ellas fundamentales para el correcto funcionamiento de microcirculación sanguínea.

En cuanto a la agregabilidad de los eritrocitos diversos factores han sido descritos a lo largo del tiempo para explicar estas características (Rovel *et al.*, 1979; Fukada & Kaibara, 1980). En condiciones fisiológicas el gradiente de velocidad aparente es el primer responsable de esta agregabilidad, así como también las propiedades fisicoquímicas que presenta el plasma, especialmente relacionadas con el fibrinógeno. Este último, mediante enlaces débiles se agrupa con los eritrocitos permitiendo que estos se agreguen a través de fuerza iónica. Por último, el hematocrito a través de la frecuencia de colisión (Ψ), ayudará también a la agregación eritrocitaria.

Puntos claves Parte 2

- La hemoreología es la ciencia que estudia el comportamiento del flujo y la deformación de los elementos celulares de la sangre.
- El flujo sanguíneo presenta componentes viscoso y elástico, que son fundamentales para la comprensión de la hemoreología bajo diferentes condiciones ambientales.
- La medición de la viscoelasticidad de la sangre, bajo un flujo pulsátil, proporciona una mejor comprensión fisiológica del flujo sanguíneo en condiciones específicas.

Parte 3: Células madre y citometría de flujo

1.6. Células madre

1.6.1. Historia y evolución de células madre

El interés de la ciencia por estudiar el área de la regeneración celular siempre ha sido un desafío. En el año 1958, el doctor Jean Dausset, descubrió los antígenos leucocitarios humanos o HLA (Human Leukocyte Antigen) basado en la idea de desarrollar trasplantes alogénicos en precursores hematopoyéticos (Dausset *et al.*, 1958). Con este gran avance, se abrió el campo de estudio de la médula ósea y los precursores hematopoyéticos con fines terapéuticos, sin embargo, no fue hasta 1968 que se hizo el primer trasplante de médula ósea en entre dos hermanos.

Durante los años 70` los numerosos trabajos publicados por el grupo del doctor Friedenstein (Friedenstein *et al.*, 1968, 1970, 1978), permitieron avanzar en el estudio de células troncales mesenquimales. Este grupo pudo observar por primera vez como células adherentes a la médula ósea que, formaban parte del estroma mesenquimal daban origen a un microambiente hematopoyético, las cuales fueron llamadas unidades formadoras de fibroblastos o CFU-F (colony-forming units fibroblast). Así también, en esta misma época Gail Martin y Martin Evans, describen por primera vez células con características precursoras en la masa celular interna del embrión del ratón (Martin & Evans, 1975).

En los años posteriores, numerosos investigadores comenzaron dar a conocer sus trabajos en donde habían logrado caracterizar poblaciones celulares de médula ósea (Ashton *et al.*, 1980; Piersma *et al.*, 1983), sin embargo, el grupo de Owen *et al* fueron los primeros en demostrar que con una pequeña porción de médula ósea en cultivos *en vivo*, se observaba una gran proliferación y diferenciación celular (Owen & Friedenstein, 1988; Guleria *et al.*, 2013).

En 1988 comenzó a generar gran interés las células encontradas en el cordón umbilical, cuando en el Hôpital Saint-Louis de Paris, la Dra. Elianne Gluckman dirigió el primer trasplante a un joven que padecía anemia de Fanconi (Gluckman *et al.*, 1989).

Las investigaciones continuaban y años más tarde Caplan *et al.* desarrollaron una metodología de cultivo y trasplante de células mesenquimales de humano, con el fin de obtener la formación de hueso (Haynesworth *et al.*, 1992). Hasta que en 1998, el Biólogo James Thomson, descubrió que células derivadas del blastocito pueden ser cultivadas y dar origen a tejidos especializados (tejido cardíaco, epidérmico y neuronal) (Thomson *et al.*, 1998). Acto seguido, en 1999, se realizó la impresionante manipulación de células de ratón para generar células especiales acuñándose el nombre de “diferenciación” (McDonald *et al.*, 1999).

Así los avances de la ciencia en relación a las células madre son innumerables desde sus inicios a la actualidad, contemplando que ya en 2006 se obtenían las primeras células madre pluripotentes inducidas (iPS)(Schultz *et al.*, n.d.) y que al año siguiente se anunciaba el tratamiento de la Diabetes Tipo I a través del uso de células madre hematopoyéticas (Voltarelli *et al.*, 2007).

Hoy en día un informe presentado en diciembre y elaborado por Elsevier, el Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS) de la Universidad de Kioto y el consorcio EuroStemCell indicaba que la investigación en células madre está creciendo dos veces más rápidamente (7 %) que la de otras áreas (2,9 %) (Zárate, 2014), esto nos indica el gran interés por la comunidad científica por seguir avanzando en múltiples aplicaciones de estas células y en sus esperanzadoras funciones regenerativas.

1.6.2. Definición y características

La vida, que comienza con un ovulo fertilizado y sometido a múltiples divisiones celulares, da paso a miles de millones de células que forman nuestro cuerpo. Llegado a ciertos estados de desarrollo, algunas células comienzan a especializarse dejando de hacer copias de sí mismas, llegando hasta el momento en que casi todas las células de nuestro cuerpo están especializadas. Sin embargo, hay un grupo celular que posee la capacidad de crear y mantener este sistema y con él la auto-renovación celular, las llamadas células madre.

Las células madre o *Stem Cells* (SC) constituyen la reserva que tiene nuestro cuerpo, para dar origen a células especializadas que se encuentran gastadas o dañadas y que por su condición son incapaces de realizar copias de sí mismas mediante la división celular (Asahara *et al.*, 1997)

Una de las características principales de la célula madre es que no posee propiedades fisiológicas especializadas, pudiendo realizar copias tanto de sí mismas (auto-renovación) como de otros tipos de células más especializadas (diferenciación), siendo ambas propiedades reguladas por mecanismos estocásticos (Stella *et al.*, n.d.).

Debido a esta característica son esenciales para el mantenimiento de tejidos que se renuevan constantemente como la piel y el intestino, así como también del músculo, que con frecuencia puede aumentar según las necesidades del organismo o sufrir daños durante el ejercicio físico (Zammit *et al.*, 2006). La sangre es uno de los tejidos que mayor dependencia en relación a estas células ya que los 100.000 millones de nuevas células sanguíneas que se necesita producir diariamente, son responsabilidad de células madre. Aquellas que actúan en el sistema circulatorio se encuentran en la médula ósea y puede producir 8 tipos distintos de células especializadas (Gunsilius *et al.*, 2001).

Hoy en día el gran desafío es identificar y reproducir las señales internas y externas que posibilitan la expresión y diferenciación de estas células, pudiendo recrear estas señales basado en los objetivos de direccionar el sistema de regeneración celular.

1.6.3. Clasificación según estado evolutivo

1.6.3.1. Células madre embrionarias o germinales

Son aquellas células madres que derivan del embrión de los mamíferos en su etapa de blastocito que corresponde a cuando el embrión tiene de 5 a 6 días. Posee en uno de sus polos una agrupación celular llamada embrioblasto. Las células que lo integran poseen características pluripotenciales ya que son capaces de formar diversos tipos de células del organismo, incluidas su auto-renovación. Además el blastocito posee una capa celular aplanada llamada trofoblasto, que es de donde derivará la placenta (Hernandez & Dorticós, 2004).

Estas células embrionales *in vivo*, no mantienen indefinidamente su capacidad de generación de cualquier tipo celular, ya que se diferencia progresivamente en relación a la fase uterina de desarrollo. Sin embargo, cuando son cultivadas *in vitro*, son capaces de proliferar ilimitadamente, pudiendo dar origen a cualquier tejido del organismo (Desbaillets *et al.*, 2000; Verfaillie *et al.*, 2002).

Aunque estas células cumplen un rol fundamental en el estudio de la medicina regenerativa y su aplicación terapéutica en enfermedades humanas, también han sido fuerte cuestionamiento en relación a su manipulación y destino, debido principalmente a asuntos éticos y religiosos que aún están en discusión.

1.6.3.2. Células madre somáticas o adultas

Estas células corresponden a células especializadas y por ende, restringidas en su capacidad de diferenciación, siendo capaces de generar solo células del tejido en que se encuentran, cumpliendo una función de recambio celular (Daley *et al.*, 2003; Kørbling & Estrov, 2003). Sin embargo, en los últimos años se ha comprobado que algunas células adultas, también pueden diferenciarse en células de diferente linaje (Jackson *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2000; Krause *et al.*, 2001; Grant *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2002).

Ejemplo de ello son las células hematopoyéticas las cuales se ha observado que pueden diferenciarse en diversos tejidos como musculo estriado, endotelio, musculo cardiaco, musculo estriado, hepatocitos, neuronas, piel, intestino y musculo esquelético (Theise *et al.*, 2000a, 2000b; Krause *et al.*, 2001; Grant *et al.*, 2002; Orlic *et al.*, 2002; Rafii & Lyden, 2003a; Daley *et al.*, 2003). Por lo tanto los criterios de especificación de las células madres adulta han ido cambiando debido principalmente a que criterios de células embrionarias, también los cumplen algunas células madres hematopoyéticas.

Diversas investigaciones han señalado que estas células madre se encuentran en varios sitios de nuestro cuerpo, como la sangre periférica, medula ósea, musculo esquelético, piel, hígado, pulmón sangre de cordón umbilical, pulpa dentaria entre otros, con lo cual crea nuevas perspectivas en relación a la reparación de estos tejidos y su posible diferenciación a otros linajes. (Verfaillie *et al.*, 2002; Zuk *et al.*, 2002; Lopez Moratalla, 2003; Mina & Braut, 2004; Morris *et al.*, 2004).

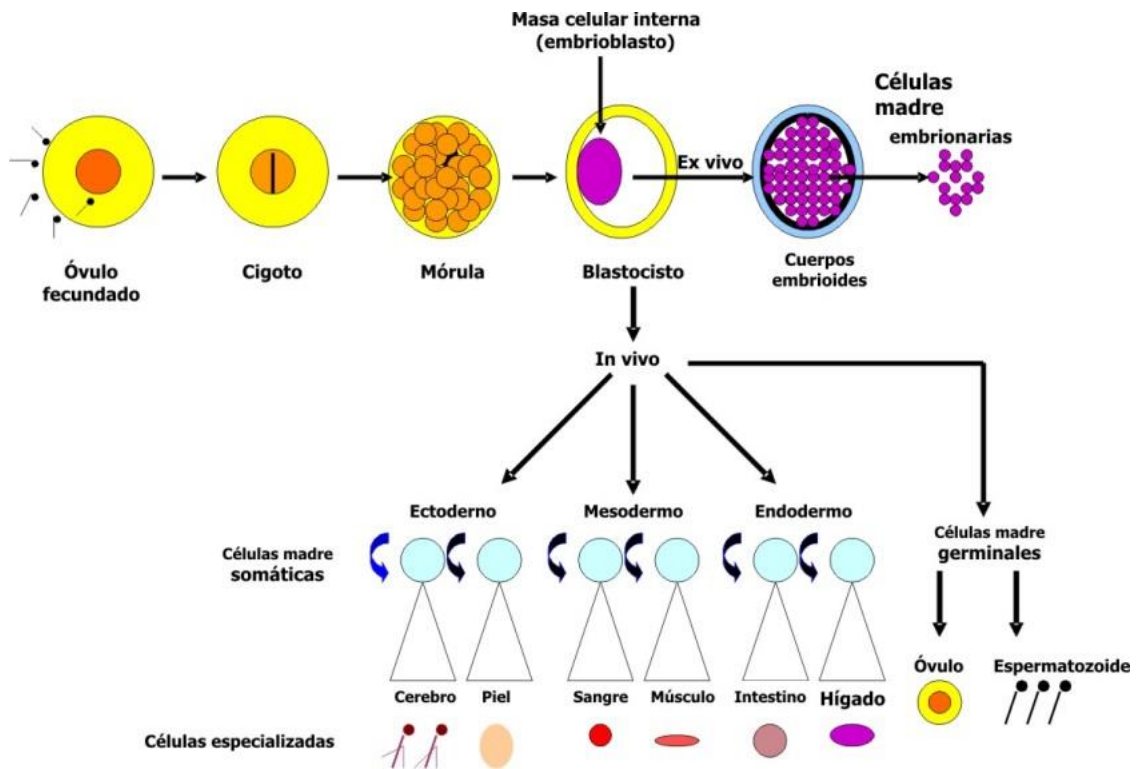


Figura 12. Diferenciación de células madres embrionarias y adultas (Hernandez & Dorticós, 2004)

1.6.4. Clasificación según su potencial celular

Las células madre también pueden ser clasificadas según la capacidad y posibilidades de diferenciación que posee, de acuerdo con el orden jerárquico de desarrollo en la que se encuentre, pudiendo clasificarse en: totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes (Weissman *et al.*, 2001; Prósper & Verfaillie, 2008).

Totipotentes: son células madre embrionarias en etapas iniciales y tienen el potencial de diferenciación más importante de todas las células madre, porque son las únicas que pueden dar origen a todo el organismo.

Pluripotentes: son células procedentes de cualquiera de las 3 capas embrionarias y pueden encontrarse en una serie de tejidos como el cordón umbilical o la masa celular interna del blastocito. Aunque por sí solas no pueden dar origen a un individuo, si pueden diferenciarse a todo tipo de células y tejidos del organismo. Las células madre adultas mesenquimales y hematopoyéticas corresponden a esta clasificación.

Dentro de esta categoría se encuentran las iPS (induced Pluripotent Stem Cells) que son células madre adultas que mediante la reprogramación genética, los científicos han logrado reconvertir en pluripotenciales, teniendo las mismas características que las provenientes del embrión.

Multipotentes: son células que logran diferenciarse a distintas células, pero solo provenientes de su misma capa embrionaria. Algunas de estas células pueden presentar diferenciación celular muy similar a las embrionarias, según las condiciones de cultivo. Tal es el caso de las MAPC (*multipotent adult progenitor cells*), que son células obtenidas de células estromales de la médula ósea y mantenidas en condiciones específicas pueden generar la mayoría de tipos celulares de las capas embrionarias (Daley *et al.*, 2003). También se pueden encontrar células multipotentes en el líquido amniótico.

Unipotentes: son aquellas células que solo pueden diferenciarse en un tipo celular y han sido catalogadas como células precursoras (Rosenthal, 2003) o progenitoras comprometidas (Verfaillie *et al.*, 2002). Un ejemplo, son las células madre epidérmicas encontradas en la capa basal de la piel, las cuales solo producen escamas queratinizadas (Niesler, 2004).

1.6.5. Células madre en médula ósea

En el año 1957, el equipo del doctor E. Donnall Thomas, fue el primero que realizó trasplantes de médula ósea con la convicción de la existencia de una célula precursora que originan todas las líneas celulares hematopoyéticas (Thomas *et al.*, 1957).

Los avances de la ciencia en esta materia han llegado a desvelar que la composición de la médula ósea es más compleja de lo que se pensaba, ya que en ella se han identificado varios grupos de células madres adultas que pueden ser clasificadas en: células madres hematopoyéticas (HSC), células madre mesenquimales (MSC), células progenitoras adultas multipotentes (MAPC) y células madre de población lateral o *Side Population* (SP) (Hernandez & Dorticós, 2004).

Uno de los mayores intereses científicos en relación a las células madres de la médula ósea está enfocado en comprender como y porque estas células migran hacia diferentes tejidos de nuestro cuerpo como la sangre. Esta información permitiría replicar estas señales en pos de su potencial utilización clínica. Tal es el caso de las HSC, que cuando se movilizan a la sangre permite recolectarlas fácilmente para su trasplante posterior, comprendiendo que su anidamiento en la médula ósea es determinante para el éxito del trasplante (Méndez-Ferrer *et al.*, 2010).

Así también, los nuevos trabajos de células madre en médula ósea, nos permiten saber hoy en día que HSC y MSC conviven en un mismo microambiente específico de la médula ósea llamado “nicho hematopoyético”. En este nicho las MSC cumplen un rol fundamental, ya que se ha demostrado que a través de la presencia de nestina, una proteína presente en su citoesqueleto, se puede estimular la migración de HSC desde la médula ósea a la sangre (Méndez-Ferrer *et al.*, 2010).

1.6.5.1. Células madre mesenquimales (MSC)

Las MSC (del inglés Mesenchymal Stem Cell) (Koç & Lazarus, 2001) son también conocidas como células estromales, debido a su procedencia del estroma de la médula ósea (Prosper & Verfaillie, 2003). Estas células fueron las primeras células no hematopoyéticas que se aislaron en médula ósea, y poseen la capacidad de diferenciarse en variados tipos celulares (Wobus, 2008) incluyendo condrocitos, adipocitos, mioblastos, cardiomiocitos, neuronas y astrocitos tanto *in vivo* como *in vitro* (Pittenger *et al.*, 1999; Salem & Thiemermann, 2010), aunque su principal función parece ser la formación del esqueleto a través de los osteocitos (Méndez-Ferrer *et al.*, 2010).

A pesar de su increíble potencial terapéutico, las funciones de MSC no han podido ser estudiadas con facilidad debido a la falta de marcadores genéticos, aunque se sabe que la nestina encontrada en su citoesqueleto es fundamental para estudiar su capacidad de autorrenovación en el modelamiento del hueso adulto (Méndez-Ferrer *et al.*, 2010).

Además de encontrarse en médula ósea, estas células también se pueden aislar en testículos, tejido adiposo, hígado, bazo, fluido amniótico, páncreas, periostio, membrana sinovial, músculo esquelético, dermis, cordón umbilical humano, pulmón, pulpa dental, e incluso de sangre periférica. (Chen *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2008; Vallée *et al.*, 2009; Vater *et al.*, 2011). Su potencial regenerativo ha sido propuesto para en diferentes enfermedades neurológicas (Woodbury *et al.*, 2000) además del Parkinson y el Alzheimer, lesiones de médula espinal, quemaduras, enfermedades cardíacas y osteoartritis entre otras condiciones (Gomillion & Burg, 2006).

1.6.5.2 Células madre hematopoyéticas

Las HSC, sin lugar a dudas han sido las células madre más estudiadas durante los últimos 50 años, debido a su gran efectividad en el tratamiento de diferentes enfermedades y al trasplante que se hace de ellas con el fin de reconstruir el sistema hematopoyético.

Aunque en un comienzo se pensaba que solo estas células podían ser encontradas en medula ósea, hoy en día se pueden utilizar con fines terapéuticos extrayéndolas de sangre periférica, producto de la movilización que se puede hacer a través de factores de crecimiento como es el caso del *granulocyte-colony stimulating factor* o *G-CSF* (Metcalf, 1985).

Las HSC, proveen billones de células sanguíneas maduras por día a nuestro organismo. Cada una de ellas son fundamentales para mantener la homeostasis en nuestro cuerpo (Attar & Scadden, 2004) y se ha comprobado que, aunque la mayoría de HSC permanecen quiescentes en fase G0, en algún momento pueden entrar al ciclo celular para dividirse (Ezoe *et al.*, 2004).

Hoy en día los marcadores celulares de HSC han sugerido que existe un progenitor común para estas células y las células progenitoras endoteliales (EPC). Actualmente se asume que el hemangioblasto es el progenitor común para EPC y HSC (Grant *et al.*, 2002), lo que explica el potencial endotelial de las HSC en la medula ósea y su presencia en procesos angiogénicos y vasculogénicos (Rafii & Lyden, 2003b).

Además las HSC han demostrado un alto potencial de diferenciación en la regeneración de diversos tejidos (Kørbling & Estrov, 2003). En modelo animal, se pueden observar participando en músculo esquelético, músculo cardíaco, neuronas hepatocitos, células endoteliales, alvéolos pulmonares, bronquios, tracto digestivo y piel (Theise *et al.*, 2000a; Daley *et al.*, 2003). Así también, en humanos se han podido comprobar diferentes sitios en donde HSC pueden tener un papel diferenciador importante, como en osteoblastos, hepatocitos, epitelio gastrointestinal, cardiomiocitos, piel y células de Purkinje (Theise *et al.*, 2000a; Daley *et al.*, 2003; Kørbling & Estrov, 2003). Estas evidencias apoyan la teoría que las HSC que proceden de la médula ósea, viajan a través de la sangre pudiendo implantarse en diferentes tejidos, para luego adquirir características específicas que ellos que incidan en procesos de regeneración.

1.6.5.3. Side Population

Una fracción de la población de células madre de médula ósea, conocidas como células de población lateral o Side Population, se ha convertido en una característica importante para la definición del compartimento de SC.

Aunque habitualmente las HSC se han identificado mediante su inmunofenotipaje de membrana a través de citometría de flujo, otra interesante estrategia es evaluarlas según su capacidad funcional para emitir mayor o menor fluorescencia cuando se analizan a través de FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*). Esta técnica se basa en determinar su mayor o menor capacidad para expulsar esos citofluorocromos, siendo dos de los más características el Hoechst 33342 y el DyeCycle Violet.

A través de citometría de flujo se pudo comprobar que esta capacidad de eliminación de citofluorocromos se debe a que esta subpoblación de células madre posee dos tipos de transportadores en su membrana, que se unen con ATP y son miembros de la familia ABC (*ATP-binding cassette*), estos son: ABCG2 y la glicoproteína P (P-gp) (Eaker *et al.*, 2004). Estos transportadores son los responsables de las características resistentes y de extrusión que poseen las SP, siendo este mecanismo utilizado como medio de autoconservación celular (Zhou *et al.*, 2001). Además la presencia de los transportadores ABCG2 constituye un indicador de una célula madre muy primitiva dentro de las SC (Scharenberg *et al.*, 2002).

Cuando se estudia este grupo de SP por citometría de flujo, se distinguen un patrón característico en el cual se observa en la imagen con una especie de “cola” en relación al cúmulo de células con características de SC, por lo que de ahí deriva su nombre de *side population*. Se ha observado que esta subpoblación celular se encuentra en estado quiescente hasta que son activadas mediante diferentes mecanismos los cuales incluyen la adición de citosinas (Quaini *et al.*, 2002). Experimentos de repoblación demostraron que estas células SP, contienen la gran mayoría de la actividad HSC desde la médula ósea murina, aunque necesitan estar enriquecidas por lo menos 1000 veces más que las HSC, antes que la reconstitución *in vivo* se produzca (Goodell *et al.*, 1996).

Además se ha demostrado que las SP pueden dar lugar a diferentes tipos de células especializadas que incluyen tejidos no hematopoyéticos (Polli, 2000; Prosper & Verfaillie, 2003) pudiendo tener un importante valor terapéutico para la medicina regenerativa (Alvi *et al.*, 2003; Barquinero *et al.*, 2005)

1.6.5.4. Células progenitoras multipotentes adultas

En el año 2001 el laboratorio de Catalina Verfaillie en la Universidad de Minnesota, descubrió de forma accidental una población celular con características diferentes a la mayoría de las células madre, mientras intentaban seleccionar y cultivar células MSC.

Este nuevo grupo celular presentaba características de células madre somáticas adultas con una capacidad de proliferación inagotable y diferenciación pluripotente tanto *in vitro* como *in vivo* (Reyes *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2002).

Estas células se denominaron MAPC (*multipotent adult progenitor cells*). Las MAPC representan una población de células progenitoras más primitivas que las MSC (Van't Hof *et al.*, 2007). Luego que se introducen en blastocistos murinos, pueden generar la mayoría de los tipos celulares derivados de cualquiera de las 3 capas embrionarias (Verfaillie *et al.*, 2002), mostrando en ser humano, ratón y rata la capacidad de diferenciar con éxito a osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos esqueléticos (Reyes *et al.*, 2001). Además se ha observado que puede diferenciarse en células con características morfológicas, fenotípicas y funcionales de las células endoteliales (Reyes *et al.*, 2002), y de hepatocitos (Schwartz *et al.*, 2002).

Esta amplia plasticidad que se observa en las MAPC emulan las características de las células madre embrionarias, mientras que las características de células madre adultas y su obtención de medula ósea autóloga las hace más susceptibles de aplicación terapéutica. Además se ha visto que puede ser capaz de proliferar a más de 120 divisiones celulares sin un aparente envejecimiento (Prosper & Verfaillie, 2003).

Hoy en día los factores limitantes para el empleo de las MAPC, son las condiciones tan especializadas que son necesarias para su cultivo, principalmente la densidad celular, concentración de CO₂, el pH del medio, la utilización de muchos de suero fetal de ternera, e incluso el tipo de plástico de cultivo que se utiliza (Verfaillie, 2004).

Por otra parte, las condiciones que se requieren para que se diferencien en tipos celulares específicos no están totalmente esclarecidas, por lo que esto es un tema de gran interés y objeto en la actualidad de diversas investigaciones (Daley *et al.*, 2003).

Aun así la identificación de las MAPC abre nuevas perspectivas a su posible aplicación terapéutica, además de proporcionar nuevas perspectivas al estudio y el comportamiento de las células madre.

1.6.5.5. Células Ovais

El año 1999, se obtuvieron células ovais (células progenitoras) a partir de HSC de médula ósea, las cuales migran al hígado para dar paso a la regeneración de este tejido (Petersen *et al.*, 1999).

El hígado es un órgano que presenta distintos tipos de cicatrización dependiendo de la gravedad de esta (Lorenti, 2001). En daños mínimos o moderados no se activa la señal de células ovais, y solo se resuelve por la proliferación de tejido conectivo. Sin embargo, en presencia de daños más graves, el hígado se regenera de forma muy rápida debido a la presencia de células ovais, hepatocitos y células epiteliales biliares (Oertel & Shafritz, 2008).

Investigaciones evidenciaron en modelo animal y más tarde en humanos, que en la médula ósea también se encuentra una población de células ovais que poseen una capacidad generativa bipotencial, siendo capaces de dar paso a hepatocitos y células epiteliales involucradas en los ductos biliares (Theise *et al.*, 2000a, 2000b; Petersen, 2001).

Debido a las características inmunofenotípicas similares a las células ovais, que poseen una pequeña subpoblación de células de la médula ósea, es que sabemos que dentro del conjunto de células medulares se encuentra una porción de células ovais que pueden contribuir a la regeneración hepática en caso de que la señalización de este órgano la requiera (Verfaillie *et al.*, 2002), transformándose en células itinerantes y con pleno potencial regenerativo en el hígado (Sarradell *et al.*, 2010).

Todos estos estudios, nos sirven para comprender la heterogeneidad que poseen el conjunto de células presente en la médula ósea y lo importante que son para la regeneración de tejidos en todo el organismo, previa vía de señalización.

1.6.6. La relación existente entre las células madre, la hipoxia y el ejercicio.

1.6.6.1. Hipoxia y células madre

Como se ha visto, las células madre responden a señales ambientales que activan su proceso de auto-renovación o diferenciación, dependiendo del requerimiento del tejido involucrado (Fuchs & Segre, 2000). Uno de los estímulos que se ha visto que tiene directa incidencia con la activación de las células madre es la hipoxia (Zhu *et al.*, 2005a; Grayson *et al.*, 2007). El oxígeno es un potente controlador y activador de cascadas de señalización que regulan la expresión de células madre o células progenitoras en nuestro organismo. Ejemplo de ello es HIF-1 quien regula la transcripción de un numerosos genes, como los de la eritropoyetina (EPO) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Ambos cumplen roles fundamentales en equilibrio homeostático del oxígeno celular y sistémico (Semenza, 2000).

Sabemos que las HSC y MSC residen en lugares severamente hipóxicos dentro de la médula ósea y que esta condición favorece directamente a las HSC mejorando su proliferación y capacidad de auto-renovación (Ivanović *et al.*, 2000; Eliasson & Jonsson, 2010). Está bien establecido que el estímulo hipóxico intermitente aumenta las HSC, pudiendo ser utilizado para mejorar el sistema inmunitario (Serebrovskaya *et al.*, 2011). Además en combinación con estímulos como el ejercicio, se ha observado que tanto la hipoxia hipobárica (Theiss *et al.*, 2008), como la hipoxia hipobárica intermitente (Viscor *et al.*, 2009), han incrementado las HSC circulantes en sangre.

Aunque la hipoxia por si misma incrementa la proliferación de múltiples SC (Grayson *et al.*, 2007), en el caso de las MSC se ha observado que puede aumentar su pool 15 veces al ser expuesta a hipoxia crónica en muestra animal (Rocheffort *et al.*, 2006). Las MSC circulantes, en condiciones fisiológicas, han sido detectadas con escasa frecuencia

y aun no se logra obtener un protocolo claro para aislarlas en sangre periférica (He *et al.*, 2007), sin embargo en estudios realizados con apnea obstructiva, se ha podido observar un aumento de MSC circulante, luego de 5 h de este proceso que involucra hipoxia intermitente e inflamación (Carreras *et al.*, 2009).

Múltiples investigaciones sugieren que la hipoxia es un estímulo sensible para la presencia de MSC en sangre (Ceradini *et al.*, 2004; Ceradini & Gurtner, 2005), implicando a HIF-1 α como el responsable de inducir su movilización (Rocheffort *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2011), lo cual permitiría que estas células dejaran su nicho en la médula ósea y pasara a la sangre periférica con el objetivo de migrar al tejido requerido.

Otro factor de tener en cuenta, en cuanto a los efectos de la hipoxia, es su incidencia en los procesos angiogénicos y vasculogénicos en los cuales se incluye la activación de EPC (Asahara & Kawamoto, 2004; Murasawa & Asahara, 2005). La creación y proliferación de nuevos vasos sanguíneos es de suma importancia en procesos regenerativos, por lo que las EPC derivadas de la médula ósea que circulan por sangre periférica, tienen un papel fundamental en neovascularización del endotelio lesionado (Asahara *et al.*, 1997; Urbich & Dimmeler, 2004).

Luego de procesos hipóxicos dependientes de HIF-1, se liberan VEGF y EPO, que estimulan la movilización de EPC de médula ósea hacia la sangre periférica (Bahlmann *et al.*, 2003; Fandrey, 2004). Esta proliferación de EPC, permite que estas células se adhieran y se incorporen a capas del endotelio (Iwaguro *et al.*, 2002) en tejidos expuestos a hipoxia, siendo el conjunto de factores provocados por ésta, los que provoca lo que posiblemente determine la diferenciación de EPC (Blau *et al.*, 2001).

En cuanto a las SP de médula ósea, las cuales tienen un alto poder de diferenciación en modelo animal y humano (Dubinska-Magiera *et al.*, 2013), se ha observado que están estrechamente ligadas a la diferenciación celular de HSC (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2004). Bajo condiciones hipóxicas las células marcadas con transportadores ABCG2 mejoran la supervivencia (Krishnamurthy *et al.*, 2004a), y también en cultivos celulares bajo estas mismas condiciones se logran diferenciar las SP a linaje endotelial (Maruyama *et al.*, 2013).

Estas células por su alto grado de resistencia a fármacos debido a la acción de sus transportadores ABC, han sido de gran interés de estudio para tratamientos contra el cáncer, ya que por un lado protegen a la célula de diferenciación o cambios (Balbuena *et al.*, 2011), cumpliendo un importante rol en la barrera funcional de tejidos y su acción protectora de xenobióticos (Leslie *et al.*, 2005). En este contexto también se ha comprobado que el estrés provocado por el estímulo hipóxico puede mejorar la acción de las SP, lo cual pasa frecuentemente en la progresión del tumor en el mieloma múltiple (Wen *et al.*, 2014).

1.6.6.2. Ejercicio y células madre

El músculo esquelético es el responsable principal tanto del movimiento como del mantenimiento de la postura del ser humano. Su regeneración y crecimiento está ligado principalmente a la acción de las células madre residentes en él, llamadas “Células Satélite”.

Las células satélite son células madre musculares que se han identificado por su conexión directa a las fibras musculares, ya que se localizan entre la lámina basal y el sarcolema (Mauro, 1961). Estas células en el músculo adulto, están en un estado quiescente en condiciones fisiológicas normales y representan entre el 2,5% a 6% de todos los núcleos de fibras musculares (Asakura *et al.*, 2002; Fujimaki *et al.*, 2013). Cuando son activadas por una lesión muscular, estas células proliferan, se auto-renuevan y se diferencian, para dar origen a nuevas fibras musculares en pocos días (Chargé & Rudnicki, 2004), sin embargo su capacidad de auto renovación es limitada, lo que significa que en condiciones patológicas el músculo esquelético puede padecer degeneración (Wahl *et al.*, 2008).

La activación de las células satélite inducida por el ejercicio, se relaciona especialmente con el ejercicio excéntrico, pudiéndose observar un incremento de estas tanto en modelo animal (Umnova & Seene, 1991; Smith *et al.*, 2001), como en humanos (Kurosaka, 2012), bajo estas condiciones.

Las características de estas células de diferenciación y auto renovación, observadas tanto *in vivo* como *in vitro* cumplen con la clasificación básica de las células madre.

Además, algunos estudios han comprobado que su inmunofenotipificación presenta marcajes similares a las EPC. Por tanto, se ha planteado la posibilidad de un origen común para ambos tipos de células (Kardon *et al.*, 2002), así como también que las EPC pueden ser capaces de diferenciarse en células satélites (Hwang *et al.*, 2004; Zammit *et al.*, 2006).

Durante el ejercicio, se ha demostrado que se generan una serie de estímulos mecánicos, metabólicos e hipóxicos que estimulan de manera importante el aumento de células madre circulantes, desempeñando un papel clave en el tratamiento y la regeneración del daño muscular inducido por el entrenamiento (Kurosaka *et al.*, 2012).

Numerosos estudios han demostrado que el ejercicio mejora la regeneración del sistema cardiovascular y el músculo esquelético, mediante la movilización de células madre de estos órganos (Cramer *et al.*, 2007) y también mediante el reclutamiento de células madre o progenitoras circulantes en sangre (Laufs *et al.*, 2004). Así se ha podido observar que existe un aumento de HSC provocado por el ejercicio, el cual está relacionado con su determinante participación que tienen en el proceso de regeneración muscular (Sherwood *et al.*, 2004; Abedi *et al.*, 2007a), produciéndose además un reclutamiento de HSC circulantes en la sangre periférica para lograr este objetivo (Laufs *et al.*, 2004).

En el caso de las EPC, el aumento del reclutamiento en sangre periférica provocada por el ejercicio, se debe a que cumple un rol crítico en la fase temprana de la regeneración muscular (Wagatsuma, 2007a). Aunque estudios han observado un aumento de EPC en humanos tras doce semanas de ejercicio (Hoetzer *et al.*, 2007), la importancia de la presencia EPC se ve justificada por el importante papel que tienen en la contribución de la regeneración vascular y angiogénesis que se induce por el mismo ejercicio (Sarto *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2013).

Aunque hace algún tiempo se presumía que las células satélite eran las únicas células madre comprometida en el musculo y responsables del crecimiento postnatal y la regeneración de este (Seale & Rudnicki, 2000), estudios posteriores demostraron que también hay una población de células madre adultas, llamadas “Células Madre Derivadas de Músculo” o MDSC (*muscle-derived stem cell*). Estas MDSC exhiben la capacidad para reconstituir todos los tejidos hematopoyéticos después de la inyección intravenosa en ratones irradiados (Jackson *et al.*, 1999; Kawada & Ogawa, 2001).

Estas MDSC aisladas por FACS a través del protocolo de SP, registran la misma actividad regeneradora de miotubos que las SP derivadas de médula ósea (Gussoni *et al.*, 1999). Además representan una importante función, al observarse que en músculo-Pax7 deficiente, estas células SP de músculo exhiben un alto nivel de actividad progenitora hematopoyética, aun en ausencia de células satélite miogénicas (Seale *et al.*, 2000).

Estos datos nos confirman, que las MDSC son una población celular distinta de las células satélites. Las cuales pueden diferenciar a mioblastos (Asakura *et al.*, 2002) y además mantener su actividad miogénica intrínseca después de su propagación (Lapan *et al.*, 2012), llegando incluso a poder diferenciarse en las mismas células satélite (McKinsey *et al.*, 2001).

Por lo tanto podemos concluir que la regeneración del musculo esquelético se ve influenciado por una serie de condiciones fisiológicas, en las cuales están presente células satélite y MDSC presentes en su estructura, sin embargo, son críticamente dependientes de la presencia y la función de las células madre y progenitoras circulantes derivadas de médula ósea (Wahl *et al.*, 2008).

1.7. Citometria de flujo e inmunotipificación de células madre.

La citometria de flujo, es una técnica biofísica que permite medir y analizar de forma cuantitativa y objetiva, células, núcleos, cromosomas, mitocondrias u otras partículas en suspensión (Barrera Ramirez *et al.*, 2004). En términos simples consiste en hacer pasar una muestra de células por un flujo laminar producido por otro líquido isotónico, lo cual hace que las células viajen ordenadas una tras otra. Luego un rayo láser incide en cada célula, pudiendo clasificarlas en función a tres características: su tamaño relativo (*Forward Scatter* o FSC), su granularidad o complejidad citoplasmática (*Side Scatter-SSC*) y su intensidad de fluorescencia, que es la emisión de luz provocada por los fluorocromos presentes en la célula, cuando son excitados por el láser.

Todas estas señales son transformadas en impulsos eléctricos y se digitalizan a través del procesamiento de un computador, lo cual nos permite realizar análisis multiparamétricos simultáneos, pudiendo observar características físicas y químicas en más de dos mil partículas por segundo (Shapiro HM, 2003). Además es posible separar las poblaciones de células que se requieren para el análisis (Parks & Herzenberg, 1984), lo cual corresponde a la base de la técnica conocida como FACS.

En el estudio de las células madre, FACS se ha vuelto una técnica fundamental para el logro de este objetivo, tanto por la inmunofenotipificación como por la inmunofluorescencia celular que pueden ser evaluadas bajo esta técnica. La clasificación celular puede estudiarse en base a sus propiedades fisicoquímicas, inmunológicas y funcionales.

En el caso de la clasificación inmunológica se basa en la utilización de anticuerpos que se dirigen contra moléculas celulares llamadas antígenos, específicamente a la zona denominada epítipo o determinante de antigénico. Así, la inmunofenotipificación es la técnica que se utiliza para poder identificar estas células, a través de proteínas que expresan dentro de su estructura, con el fin de poder caracterizarlas (Salgado Lynn, 2002). Junto a ella, también se utiliza la inmunofluorescencia, que se obtiene por los fluorocromo que están unidos a los antígenos (en su estructura molecular), pudiendo determinar la proporción o el número de células que poseen un determinado marcador comportándose bajo propiedades comunes.

Para poder clasificar la gran cantidad de Anticuerpos monoclonales (mAbs) generados por los diferentes laboratorios, es que se propuso en 1982 en la 1ª Conferencia Internacional de Antígenos de Diferenciación de los Leucocitos Humanos (HLDA), asignar a cada anticuerpo un factor de diferenciación que señalara la molécula que marcaba en la superficie celular, el cual lo llamaron “Cumulo de diferenciación” o CD (*Cluster of differentiation*) (Fiebig *et al.*, 1984; Bernard & Boumsell, 1984).

Los CD principalmente utilizados para la identificación linfocitaria, nos permiten clasificar a los antígenos de la superficie celular conforme progresa tanto su maduración, como su diferenciación, con lo cual se logra asignarles componentes fenotípicos únicos al estado de diferenciación en que se encuentren estas células (Bernard & Boumsell, 1984).

Entendiendo que cada célula puede presentar más de un CD, para indicar su presencia la superficie celular se utiliza un signo “+” o “*pos*” y en el caso de ausencia un “-” o “*neg*”, lo cual permite determinar de forma específica el grado de diferenciación que posee.

1.7.1. CD45

CD45 es una glicoproteína expresada de manera constitutiva en todas las células hematopoyéticas, incrementando su densidad en los estadios finales de la hematopoyesis en los diferentes linajes leucocitarios (Collino *et al.*, 2006). Su expresión aumenta durante la diferenciación normal de linfocitos B y permanece de manera estable en células maduras (Hendrickx & Bossuyt, 2001). En el caso de los linfocitos T, CD45 se expresa en varias isoformas diferentes, cada una de las cuales muestra una capacidad diferente para apoyar la activación de estos linfocitos (Cahir McFarland *et al.*, 1993). En el caso de otras células, CD45 se pierde en la maduración de los megacariocitos, eritrocitos y células plasmáticas (Dahlke *et al.*, 2004).

En definitiva, la expresión de CD45 no es la misma en todos los leucocitos en condiciones normales, lo mismo que en las diferentes neoplasias hematológicas (Tytherleigh *et al.*, 2001), lo cual contribuye a distinguir entre los diferentes tipos celulares presentes y a la identificación de pequeñas poblaciones de células (Collino *et al.*, 2006). En citometría de flujo, se ha estudiado la expresión de este debido a la importancia que tiene al distinguir tanto el linaje celular como el estadio de maduración de la mayoría de las células hematopoyéticas (Shah *et al.*, 1988).

1.7.2. CD34

CD34 es una glicoproteína que está fuertemente glicosilada y funciona como factor de adhesión célula-célula, pudiendo mediar en la unión de células madre a la médula ósea.

Aunque clínicamente la presencia de CD34 se asocia a la selección de HSC para trasplantes de médula ósea (Nielsen & McNagny, 2008), hoy en día sabemos que está presente en células madre mesenquimales, células progenitoras endoteliales, células endoteliales de los vasos sanguíneos pero no linfáticos, mastocitos, células dendríticas, en la dermis de la piel, así como las células en los tumores de tejidos blandos, entre otras estructuras (Sidney *et al.*, 2014).

Aunque su función en la célula no se conoce con exactitud (Furness & McNagny, 2006), su alta expresión en la células madre indica que estas se encuentran en una fase más primitiva en su diferenciación (Dorantes-Acosta *et al.*, 2008) y por lo tanto con una mayor potencialidad de diferenciación.

La aplicación clínica de células marcadas con CD34 +, se basa en la utilización métodos de inmunofluorescencia para detección de células madres, pudiendo aislarlas y utilizarlas tanto en investigación como para el trasplante de médula ósea.

En relación a las HSC los métodos actuales de caracterización inmunológica se realizan con marcadores de superficie celular tales como CD34 o CD133 (Wojciechowski *et al.*, 2008), así también CD34 es utilizado para el marcaje de células MSC, aunque su porcentaje en comparación a HSC es menor que 0,5% (Tong *et al.*, 1994).

Hoy en día para el estudio de HSC circulantes se utiliza un marcaje de CD34+ y CD45+ (Fritsch *et al.*, 1997; Fornas *et al.*, 2000) lo cual incide con especificidad que se trata de células con un carácter más diferenciado dentro de las HSC dentro de los protocolos de ISHAGE (*International Society of Hematotherapy and Graft Engineering protocol*) (Sutherland *et al.*, 1996).

Estudios basados en la EPC no definen un marcador específico para estas células, ya que parece ser un grupo heterogéneo asociado con diferentes perfiles de expresión de antígenos de superficie celular. Sin embargo, estas células se han caracterizado bien bajo el marcaje de CD34+ (Asahara *et al.*, 1997; Asahara & Kawamoto, 2004), aunque presentan un marcaje CD45^{neg}, que difiere de las HSC (Timmermans *et al.*, 2007; Case *et al.*, 2007).

La pertinencia de células que expresan CD34 + en relación al ejercicio y el daño muscular, se ha obtenido a lo largo de varios estudios. Estos incluyen HSC fenotipo CD34+/CD45+, con un papel importante en el proceso de regeneración del músculo esquelético (Sherwood *et al.*, 2004; Abedi *et al.*, 2007a), además la población EPC CD34 +/ CD45^{neg} que se ha visto que cumple un rol fundamentales en la angiogénesis y la vascularización durante este mismo proceso de recuperación (Wagatsuma, 2007b; Ribeiro *et al.*, 2013).

1.7.3. DCV

Para distinguir las células sanguíneas nucleadas de eritrocitos, hemos explorado la posibilidad de utilización de una sonda fluorescente llamada Vybrant® DyeCycle™ Violet (DCV). El análisis de sangre total, utilizando protocolos habilitados para citometría de flujo sin lisar la sangre, tienen ventajas sobre las técnicas convencionales de inmunofenotipo celular. La lisis de glóbulos rojos puede resultar en la depleción de leucocitos, además de lisis celular incompleta, lo que hace difícil para el estudio de células raras (Fritsch *et al.*, 1997). Además, los eritrocitos de rata son más resistentes a la lisis que los eritrocitos humanos, por lo que se debe repetir los pasos de lisis para precisar la muestra en el citómetro. Para evitar estos problemas, se decidió realizar una serie de mediciones de células de rata utilizando citometría, centrados en combinación con metodología desarrollada previamente, cuyo objetivo es detectar las células CD34 + humanas (Fornas *et al.*, 2000).

DCV es una tinción ideal para el análisis de contenido de ADN en las células vivas, ya que es permeable en la célula y luego de su unión a la doble cadena de ADN, emite una señal fluorescente que es proporcional a la masa de ADN (Telford *et al.*, 2007). Además puede excitarse con láser violeta y ultravioleta creando una emisión de ~ 440 nm.

El protocolo de tinción es simple, ya que incluye la incubación de células suspendidas en la presencia de DCV y la medición directa de la fluorescencia, sin la necesidad de tratamiento adicional o centrifugación (Invitrogen, 2006), pudiendo ser utilizado para la tinción simultánea con anticuerpos.

Curiosamente, el DCV es un sustrato para las bombas de resistencia a múltiples fármacos expresadas en células madre hematopoyéticas. Células CD34 + se enriquecen en P-glicoproteína (P-gp). En 1991, Chaudhary *et al.*, Se encontró que la tinción de células de médula ósea humana con tintes fluorescentes se potencia por inhibidores de P-gp y se correlacionada inversamente con la P-gp expresión (Chaudhary & Roninson, 1991; Chaudhary *et al.*, 1992). Desde que P-gp se expresa en prácticamente todas las células progenitoras hematopoyéticas, incluyendo las células de cultivo iniciadoras de largo plazo, llegaron a la conclusión de que los más altos niveles de P-gp entre los progenitores se asociaron con células que presentan características de células madre pluripotentes.

Todo estos antecedentes fundamentan la importancia de la utilización de DCV, posibilitando los ensayos funcionales de SP con excitación de laser violeta (Petritz, 2013; Telford, 2013).

Puntos claves Parte 3

- Las células madre constituyen una reserva regenerativa de nuestro organismo. Son responsables de dar origen a células especializadas, lo que les otorga un rol clave en el desarrollo de la medicina regenerativa
- En médula ósea se han encontrado HSC, MSC, MAPC y SP.
- Las HSC con células madre pluripotentes capaces de dar origen a cualquier elemento forme de la sangre, mientras que las SP poseen un alto grado de diferenciación, mostrando características más primitivas dentro de las células madre.
- Estudios han reportado que tanto el ejercicio como la hipoxia pueden provocar la activación de células madre y su posterior diferenciación.

2. OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis doctoral son:

1. Determinar si la respuesta hematopoyética desencadenada durante un programa IHH, podría provocar alteraciones en el comportamiento hemorreológico, generando efectos negativos en el suministro de oxígeno a los tejidos.
2. Cuantificar y contrastar los efectos de la IHH y el ejercicio en el aumento del número de células progenitoras en la circulación sanguínea periférica.
3. Determinar los efectos de la IHH combinada o no con el ejercicio aeróbico ligero en normoxia, genera cambios en la presencia de SP en la médula ósea.
4. Establecer la dinámica temporal en las modificaciones de la concentración de HSC, EPC y SP en los diferentes grupos de animales, según las diferentes condiciones experimentales.

**3. INFORME DEL DIRECTOR DE LA
TESIS DOCTORAL SOBRE EL IMPACTO
DE LAS PUBLICACIONES**

El doctor Ginés Viscor Carrasco, como director de la Tesis Doctoral presentada por Cristian Andrés Núñez Espinosa, hace constar que el doctorando ha participado activamente en los artículos que forman esta memoria, tal como queda reflejado en el orden y composición del equipo de autores de cada uno de ellos. El doctorando ha jugado un papel fundamental en el diseño experimental y el tratamiento de los datos. También ha tenido el protagonismo principal en el proceso de difusión, publicación de los resultados y conclusiones, es decir, en la redacción de los manuscritos y en el proceso de revisión por pares.

Los índices de impacto (IF) de las publicaciones que se han aceptado o se han enviado los artículos que conforman esta tesis son los siguientes:

Artículo I. Título de la publicación: “Effect of intermittent hypoxia and exercise on blood rheology and oxygen transport in trained rats”

Autores (p.o. de firma): Cristian Núñez-Espinosa, Anne Douziech, Juan Gabriel Ríos-Kristjánsson, David Rizo, Joan Ramon Torrella, Teresa Pagès, Ginés Viscor

Revista: Respiratory Physiology & Neurobiology **Volumen:** 192 **Páginas:** 112-117
Año: 2014 **ISSN:** 1569-9048

Participación del doctorando: Participación en el protocolo de entrenamiento y recogida de muestras. Realización de análisis hemorreológicos descrito en el manuscrito. Colaboración en la redacción del manuscrito.

I.F. (2013): 1.967

5 years I.F. (2013): 2.228

Eigenfactor Score (2013): 0.00949

Article influence Score (2013): 0.592

Times cited: 2

Artículo II. Título de la publicación: “Effects of Intermittent Hypoxia and Light Aerobic Exercise on Circulating Stem Cells and Side Population, After Strenuous Eccentric Exercise in Trained Rats”

Autores (p.o. de firma): Cristian Núñez-Espinosa, Inês Ferreira, Juan Gabriel Ríos-Kristjánsson, David Rizo-Roca, María Dolors García Godoy, Laura G. Rico, Gerard Rubi-Sans, Joan Ramon Torrella, Teresa Pagès, Jordi Petriz, Ginés Viscor

Revista: Current Stem Cell Research & Therapy **Volumen:** 10 **Número:** 2
Páginas: 132 - 139 **Año:** 2015 **ISSN:** 1574-888X

Participación del doctorando: Participación en el protocolo de entrenamiento y recogida de muestras. Preparación de muestras y análisis por citometría de flujo. Colaboración en la redacción del manuscrito.

I.F. (2013): 2.861

5 years I.F. (2013): 3.000

Eigenfactor Score (2013): 0.00236

Article influence Score (2013): 0.733

Times cited: 0 (a 19 de enero de 2015)

Artículo III. Título de la publicación: “Vybrant DyeCycle Violet stain discriminates two different subsets of CD34+ cells”

Autores (p.o. de firma): Cristian Nuñez-Espinosa, Maria Garcia-Godoy, Inês Ferreira, Juan Rios-Kristjansson, David Rizo-Roca, Laura G. Rico, Gerard Rubi-Sans, Carlos Palacio, Joan Ra,mon Torrella , Teresa Pages, Gines Viscor, Jordi Petriz.

Revista: Current Stem Cell Research & Therapy

Año: Sometido a revisión editorial

ISSN: 1574-888X

Participación del doctorando: Participación en el protocolo de entrenamiento y recogida de muestras. Preparación de muestras y análisis por citometría de flujo. Colaboración en la redacción del manuscrito.

I.F. (2013): 2.861

5 years I.F. (2013): 3.000

Eigenfactor Score (2013): 0.00236

Article influence Score (2013): 0.733

Times cited: No aplicable

Artículo IV. Título de la publicación: “Regulatory role of hypoxia on side population cells dynamics”

Autores (p.o. de firma): Cristian Núñez-Espinosa, Joan Ramon Torrella, Teresa Pagès, Jordi Pétriz, Ginés Viscor.

Revista: Stem Cells International

Año: Sometido a revisión editorial **ISSN:** 1687-966X

Participación del doctorando: Participación en el análisis y discusión de la temática abordada en el manuscrito. Colaboración en la redacción del manuscrito.

I.F. (2013): 2.806

5 years I.F. (2013): 2.827

Eigenfactor Score (2013): 0.00222

Article influence Score (2013): 0.680

Times cited: No aplicable

Dr Ginés Viscor Carrasco

Director de la tesis doctoral

Otras publicaciones adicionales que no forman parte de la tesis:

Artículo I: “Fatiga, el enemigo del movimiento en altura. VFC una opción viable de detección”

Autores (p.o. de firma): Cristian Núñez Espinosa

Revista: Motricidad y Persona **Número:** 12 **Páginas:** 47-54 **Año:** 2013
ISSN-e: 0718-3151

Participación del doctorando: Participación en el análisis y discusión de la temática abordada en el manuscrito. Redacción del manuscrito.

Artículo II: “Circadian and gender differences after high altitude acute exposure. Are early acclimation responses improved by blue light?”

Autores (p.o. de firma): Juan A. Silva-Urra, Cristian A. Núñez-Espinosa, Oscar A. Niño-Mendez, Héctor Gaitán-Peñas, Cesare Altavilla, Andrés Toro-Salinas, Joan R. Torrella, Teresa Pagès, Casimiro Javierre, Claus Behn, Ginés Viscor

Revista: Wilderness & Environmental Medicine

Año: Sometido a revisión editorial **ISSN:** 1080-6032

Participación del doctorando: Participación en el protocolo y muestreo en cámara hipobárica. Medición de variabilidad de frecuencia cardíaca. Colaboración en la redacción del manuscrito

4. DISCUSIÓN

La exposición a hipoxia hipobárica ha sido reconocida como un factor medioambiental responsable de provocar múltiples cambios a nivel metabólico y fisiológico en los seres humanos. Durante los primeros momentos de exposición el organismo realiza una serie de adaptaciones para compensar la falta de oxígeno principalmente a través del sistema nervioso autónomo basado en reflejos químicos y baroreceptores, lo que provoca un aumento del gasto cardiaco, aumento de la capacidad de difusión pulmonar y cambios en la hemoconcentración, entre otros (Reynafarje & Hurtado, 1971; West, 1998; Ricart *et al.*, 2000). Muchos de estos cambios son mediados por la vía de señalización dependiente del factor inducible por hipoxia (HIF) (Semenza *et al.*, 2006), sin embargo, el tipo y la duración de la exposición hipóxica son fundamentales para prever los tipos de cambios que se obtendrán tras la exposición.

Actualmente sabemos que la hipoxia hipobárica intermitente (IHH), es reconocida como un medio eficaz de estimular la eritropoyesis (Rodríguez *et al.*, 1999; Casas *et al.*, 2000) demostrando ser una alternativa valiosa para aprovechar los beneficios metabólicos que provoca la hipoxia sin perjudicar nuestro organismo. Este tipo de exposición ha sido estudiada con gran interés en el área del deporte, por sus múltiples beneficios en el rendimiento deportivo (Gore & Hopkins, 2005; Millet *et al.*, 2010) y en medicina de montaña, por su importante función en el proceso de aclimatación a altura geográfica (Richalet *et al.*, 1992; Casas *et al.*, 2000).

Recientemente otros potenciales beneficios de la IHH han sido reportados (Xi & Serebrovskaya, 2009), alguno de los cuales sugieren que la exposición a IHH puede incidir en el aumento de células madre (Zhu *et al.*, 2005b; Viscor *et al.*, 2009) y en la adaptación del tejido muscular a condiciones hipóxicas, lo cual favorecerían el entrenamiento en altura (Hoppeler & Vogt, 2001; Panisello *et al.*, 2008; Faiss *et al.*, 2013). Sin embargo, la correlación de ambos efectos y su relación con las posibilidades regenerativas que se pueden obtener a nivel muscular no han sido completamente abordadas.

El núcleo fundamental de esta tesis doctoral está compuesto por dos estudios que valoran cómo la exposición a hipoxia hipobárica intermitente combinada con ejercicio aeróbico ligero, puede propiciar mejores condiciones de regeneración muscular del tejido esquelético dañado. Si bien hay otras tesis doctorales en paralelo enfocadas en los resultados a nivel muscular, en este estudio nos hemos centrado en los aspectos

hematológicos. La razón de ello es la necesidad de controlar en esta situación experimental los parámetros relacionados con la serie roja, puesto que el conocido efecto hematopoyético de la hipoxia intermitente podría suponer una alteración en las condiciones reológicas sanguíneas, y por ende, en el aporte de oxígeno a los tejidos. Por consiguiente además de monitorizar el perfil hematológico completo de los animales estudiados hemos evaluado la presencia de células madre hematopoyéticas en sangre periférica y *Side Population* (SP) en médula ósea, considerando los posibles cambios hemorreológicos provocados por la condición este tipo de exposición hipóxica, los cuales afectan directamente a la microcirculación, la perfusión y el suministro de oxígeno en los tejidos.

Los diferentes grupos experimentales y tiempos de muestreo (Anexo I) fueron incluidos en uno riguroso diseño experimental (Anexo II), el cual aseguró un procedimiento de calidad en todo el proceso de estudio.

Ambos estudios midieron parámetros hematológicos bajo las mismas condiciones experimentales, sin embargo el primero de ellos estuvo enfocado a establecer los cambios hemorreológicos observados por la viscoelasticidad de la sangre, mientras que el segundo se enfocó en la detección de células madre.

Referente al estudio de las propiedades reológicas de la sangre, las diversas investigaciones que consideran la variable hipóxica dentro de sus protocolos, deben tener en cuenta que muchos tratamientos que involucran repetidas exposiciones de IHH pueden tener efectos adversos sobre algunos parámetros reológicos como la viscosidad sanguínea y el plasma (Yelmen *et al.*, 2011) afectando directamente el suministro de oxígeno en los tejidos. Basado en estudios anteriores (Viscor *et al.*, 2003; Esteva *et al.*, 2009b), se pueden obtener importantes parámetros hemorreológicos a ser considerados, no obstante, el flujo oscilatorio de la sangre se ve fuertemente afectado por parámetros como la temperatura, el gradiente de velocidad, el plasma y especialmente el hematocrito, los cuales deben ser analizados bajo condiciones experimentales que respeten la cinética de la sangre como un fluido viscoelástico (Nash & Meiselman, 1985; Thurston, 1989, 1990; Thurston *et al.*, 2004). Aunque la viscoelasticidad está determinada en gran medida por la agregabilidad y deformabilidad de los RBC (Lowe, 1988), sin duda alguna cualquier alteración en los parámetros hematológicos puede incidir en el flujo sanguíneo y en su capacidad de aporte de oxígeno a los tejidos.

Basado en estos conceptos es que los parámetros hematológicos son el punto de partida para poder comprender los primeros efectos que tienen las condiciones experimentales sobre la sangre. En ambos estudios, los parámetros hematológicos medidos fueron similares, a pesar de que los animales muestreados pertenecían a diferentes cohortes.

Los valores hematológicos para el grupo no entrenado, fueron similares a los encontrados en la literatura. Como era de esperar, los resultados de la respuesta eritropoyética provocada por la exposición intermitente a altitud simulada (Esteva *et al.*, 2009b), tuvieron directa incidencia en los grupos de sometidos a hipoxia e hipoxia-ejercicio, en los valores referidos a RBC, Hb y Hc en comparación con los otros grupos experimentales. En ambos estudios se observa un aumento paulatino de estos valores tras los días de exposición a hipoxia, los cuales son muchos más evidentes en el grupo EHYP que presenta diferencias claras con los grupos basales y con el grupo el grupo control, especialmente transcurridos siete días de tratamiento.

Aunque los grupos experimentales registraron valores altos de Hc y RBC en comparación a los no entrenados, no sucedió lo mismo con el grupo entrenado y sin daño muscular, que mostró valores más bajos en comparación con los no entrenados. Entrenamientos de duración similar pero con una intensidad mayor (4 semanas de programa, corriendo a $25 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ durante 1h diaria) mostraron una tendencia inversa en ratas Wistar (Senturk *et al.*, 2001), no obstante, la misma tendencia que la apreciada en el presente estudio sobre los parámetros hematológicos fue observada en un programa de entrenamiento más largo e intenso (Zhao *et al.*, 2013).

Hematológicamente no se encontraron valores tan altos como los reportados en otros estudios recientes en ratas que llevaron a cabo sesiones de ejercicio extenuante con protocolos de exposición hipoxia normobárica, similares a los que son ampliamente utilizados por atletas humanos (Bor-Kucukatay *et al.*, 2014). Sin embargo, los valores observados en esta tesis, indican que los efectos eritropoyéticos causados por la hipoxia tienen un efecto sinérgico con el ejercicio moderado en normoxia, pudiendo causar una mayor demanda de oxígeno transitoria en ratas con daño muscular tras el séptimo día de haber sido sometidas a estas condiciones experimentales.

Para establecer los cambios reológicos de la sangre, se tuvieron en cuenta los factores de viscosidad, elasticidad y tiempo de relajación (Anexo III). Este último parámetro indica la velocidad con la cual los eritrocitos pueden cambiar de forma y orientación, lo

cual es una propiedad importante para mantener la capacidad de perfusión en el lecho microvascular. Así, por ejemplo, su disminución se relaciona con una mayor capacidad de deformación y orientación dentro del flujo y viceversa. Por lo tanto, el tiempo de relajación es un parámetro que ayuda a comprender el tiempo de respuesta que tiene el eritrocito para progresar en la microcirculación y así favorecer al flujo sanguíneo.

En relación a las velocidades de cizallamiento evaluadas, estas fueron valores representativos de las condiciones fisiológicas circulatorias en las cuales se consideraron los efectos de agregación, transición y deformabilidad, muy bien estudiadas como condicionantes propias de la circulación sanguínea (Thurston, 1989, 1990).

Similar a como se ha observado en entrenamientos prolongados de resistencia (Connes *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013), no hubo cambios significativos en la viscosidad y elasticidad entre de los grupos basales (entrenados y no entrenados), aunque los valores del grupo entrenado tendieron a ser más bajos. Sin embargo el tiempo de relajación del grupo entrenado fue consistentemente menor, especialmente en el área de agregación (bajo gradiente de velocidad), al comparar ambos grupos, con lo cual se puede inferir que un periodo de dos semanas de entrenamiento provoca una mayor plasticidad morfológica de los eritrocitos que puede interpretarse como favorable desde un punto de vista hemorreológico. Luego del protocolo de daño muscular la viscoelasticidad cambió por completo. Todos los grupos experimentales en los primeros días post-daño muscular (fase temprana) mostraron un componente viscoelástico mayor que el grupo entrenado, posiblemente como consecuencia de los bajos valores que se observó en este último grupo. En el caso del grupo control se observó una tendencia a disminuir los valores viscoelásticos pasado siete días post-daño muscular (fase tardía), indicando una gradual normalización de estos parámetros.

Los dos grupos experimentales expuestos a la hipoxia fueron visiblemente diferentes al grupo control. En el caso del grupo hipóxico, sus valores viscoelásticos aunque se mostraron altos en la fase temprana disminuyen en la fase tardía, logrando asimilarse a los valores del grupo entrenado, pero con una mayor elasticidad y menor tiempo de relajación. Estos ajustes reológicos pueden considerarse compensatorios e interpretarse como favorables desde un punto de vista funcional ya que permitirían un ajuste

homeostático a las alteraciones en términos de microcirculación, causadas por el aumento de RBC, Hb y Hc.

El comportamiento reológico observado en el grupo hipoxia-ejercicio merece especial atención. La viscosidad en la fase temprana fue muy similar al grupo hipóxico, pero con una elasticidad y tiempo de relajación mayor. Esto podría indicar que este grupo provee una mejor deformabilidad de la membrana eritrocitaria, contrariamente a la observada en otros estudios donde las ratas fueron sometidas a diferentes protocolos de ejercicio y exposición hipóxica (Bor-Kucukatay *et al.*, 2014). Sin embargo, los valores cambian en la fase tardía, incrementándose la viscosidad sanguínea, pudiendo observar valores similares a los descritos después de exposición a hipoxia crónica (Pichon *et al.*, 2012) o hipoxia crónica intermitente (Yelmen *et al.*, 2011), pero con una tendencia a mantener una alta deformabilidad eritrocitaria, como se puede deducir de la disminución sostenida del tiempo de relajación.

La viscosidad de la sangre registrada en el grupo hipoxia-ejercicio, fue significativamente diferente en la fase tardía a los demás grupos, en todas las medidas de deformación de corte (*shear strain*) utilizadas en este estudio. Sin embargo, estas medidas, fueron similares a las encontradas en humanos y ratas después de la práctica de ejercicio físico (Connes *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013), lo cual puede explicarse debido al poco aumento de la viscosidad del plasma, el mantenimiento de los niveles altos de Hb y el elevado registro de MCV y Hc en este grupo. Este comportamiento puede indicar que hubo un mayor número de eritrocitos jóvenes en la circulación (Clark, 1988), ya que además se registró en la zona de deformabilidad un notable aumento en la elasticidad de la sangre, con los valores de tiempo de relajación similares a los encontrados en el grupo entrenado.

Los índices de transporte de oxígeno estudiados a partir del componente viscoso de la sangre también mostraron un interesante comportamiento en los diferentes grupos. Como era de esperar, el índice de transporte potencial de oxígeno en sangre (OPTI) y el índice de aporte de oxígeno (ODI), fueron considerablemente mayores en el grupo entrenado. Solamente entre uno y tres días luego del daño muscular, se observó una drástica disminución de ambos índices, alcanzando valores que se asemejan a los valores del grupo no entrenados, especialmente en el grupo sometido a hipoxia. Una disminución similar en estos índices fue observada en estudios previos que median los

efectos de la acetazolamida sobre la exposición hipoxia crónica en ratas (Pichon *et al.*, 2012). En la fase tardía los valores en los grupos control e hipoxia, aumentan nuevamente, especialmente en el grupo hipóxico cuyos valores tienden a aproximarse a los del grupo entrenado. Este efecto se debe principalmente a una disminución de la viscosidad de la sangre total, que sabemos que es causada por una disminución simultánea de la viscosidad del plasma y que es en gran parte achacable a una considerable reducción en los valores de proteínas plasmáticas y muy especialmente de fibrinógeno. Este fenómeno se ha interpretado como una respuesta compensatoria que ayuda a amortiguar el aumento de viscosidad total de la sangre causado por el hematocrito elevado tras exposición a la hipoxia (Esteva *et al.*, 2009b).

En el caso del grupo hipoxia-ejercicio, sus valores en ambos índices fueron más bajos, especialmente en la fase tardía, debido principalmente a un elevado componente sanguíneo y también, aunque en menor medida, a un aumento de la viscosidad del plasma en esta fase. Este último, por razones limitantes desde el punto de vista metodológico y de alcance de este estudio, hizo imposible determinar la influencia del fibrinógeno u otros componentes plasmáticos en la viscosidad del plasma. Sin embargo, a pesar de un potencial efecto negativo de los valores de ambos indicadores para el grupo hipoxia-ejercicio, el aumento de la elasticidad y el tiempo de relajación suponen un mecanismo compensatorio muy importante, disminuyendo el impacto desfavorable de un aumento de la viscosidad para el tejido perfundido.

Referente al análisis y detección de células madre, en este estudio se realizaron una serie de mediciones utilizando citometría de flujo (Anexo IV) combinada con un método modificado para el recuento de células CD34+ en sangre (Fornas *et al.*, 2000). Dada la importancia de la precisión en este tipo de análisis, el protocolo no consideró lavados ni lisis celular, lo cual es mucho más ventajoso que los protocolos convencionales, dado que la lisis de eritrocitos muchas veces afecta directamente en la depleción de los leucocitos, no pudiendo observarse con claridad las células objetivo (Fritsch *et al.*, 1997). Además los protocolos convencionales deben considerar que los eritrocitos en rata son más resistentes a la lisis osmótica que los de la especie humana, por lo que resulta inviable dentro de sus procedimientos contemplar un tratamiento repetido de la muestra, lo que ocasiona una gran pérdida de precisión en los datos obtenidos por citometria de flujo.

Para poder distinguir las células nucleadas en sangre, se utilizó una tinción permeable de membrana y selectiva de ADN denominada Vybrant® Dye Cycle Violet (DCV) (Telford *et al.*, 2007). El DCV puede ser usada de forma simultánea con anticuerpos y se excita con láser violeta, características que la hacen fácilmente adaptable al estudio de células madre (SC) y *Side Population* (SP) (Petritz, 2013; Telford, 2013).

Luego de la tinción de eventos positivos de ADN, se analizaron los eventos CD34+. Sorprendentemente los resultados *a priori* fueron inesperados, ya que se obtuvieron diferentes intensidades de DCV, logrando identificar dos subpoblaciones de células CD34+, las cuales se clasificaron como células CD34+/DCV^{high} y CD34+/DCV^{low}, en referencia a que la intensidad de emisión del DCV fuese más brillante u opaca respectivamente. Estudios previos han identificado diferentes grupos de células hematopoyéticas primitivas por pruebas funcionales utilizando Rodamina 123 (Rh 123) y anticuerpo CD34, lo que ha permitido clasificar las células CD34+ en dos tipos de subpoblaciones (Udomsakdi *et al.*, 1991). Además estudios complementarios han observado que la retención de Rh 123 identifica células madre hematopoyéticas humanas dentro de linaje CD34+/CD38^{neg}, llegando a la conclusión de que su utilización en la detección de células primitivas, puede tener un uso tanto experimental como terapéutico (McKenzie *et al.*, 2007). Complementariamente en 1991, Chaudhary y Roninson demostraron que los niveles más altos de P-glycoprotein (P-gp) entre los progenitores se asociaron con células que presentan características de las células madre pluripotentes (Chaudhary & Roninson, 1991). Rh123 y varios otros colorantes fluorescentes son sustratos para el transporte mediado por P-gp, la cual funciona como una bomba de salida, responsable de la resistencia a múltiples fármacos en células tumorales y que se expresa en prácticamente todas las células progenitoras hematopoyéticas, incluyendo las células de cultivo, concluyendo que los más altos niveles de P-gp entre los progenitores son asociados a células que presentan características de células madre pluripotentes.

Curiosamente, el DCV es un sustrato de P-glicoproteína (Boesch *et al.*, 2012), con lo cual se puede hipotetizar que las células CD34+/DCV^{low} también pueden mostrar las características de los progenitores primitivos, porque la retención DCV también debe ser inversamente correlacionada con la expresión de P-gp. Por lo tanto, basando en estos nuevos hallazgos se decidió estudiar la asociación de CD34 + y los dos subgrupos de DCV en relación con los grupos experimentales.

Las diferencias significativas encontradas en el conteo celular de CD34⁺/DCV^{low}, mostró que el grupo hipoxia-ejercicio tuvo un conteo mucho más alto que el grupo hipóxico en el séptimo día tras el daño muscular. También hubo diferencias significativas en el conteo celular de CD34⁺/DCV^{low} dentro del grupo hipoxia-ejercicio, en donde la diferencia fue de cuatro veces más comparando el tercer y séptimo día post-daño.

Aunque en el conteo celular de CD34⁺/DCV^{high} no se encontraron diferencias significativas, podemos postular que las células progenitoras primitivas CD34⁺, son preferentemente movilizadas por la hipoxia hipobárica intermitente, con altos valores de CD34⁺/DCV^{low} en el grupo hipoxia-ejercicio en el séptimo día luego del daño muscular.

La posible relación entre las células madre CD34⁺ y CD34^{neg} no ha sido aclarada aun, aunque se sabe que existe una estrecha relación entre la recuperación de daño muscular esquelético y el aumento de progenitores circulantes CD34⁺ (Holleman *et al.*, 2008). En relación a la hipoxia, estudios previos han determinado que la exposición intermitente a este estímulo tanto en condiciones normobaricas (Serebrovskaya *et al.*, 2011) como hipobáricas (Viscor *et al.*, 2009) incrementa el número de células madre hematopoyéticas circulantes, mientras que una prolongada exposición a hipoxia hipobárica disminuye las células endoteliales circulantes (Mancuso *et al.*, 2008). Por otra parte, las SP a nivel muscular, han sido señaladas como precursores primitivos en reposo que actuarían después de la lesión muscular, dando lugar a células satélite progenitoras que tienen una participación activa en la regeneración y reparación muscular (Rivier *et al.*, 2004; Dubinska-Magiera *et al.*, 2013). Además, las células satélite están asociadas a progenitores miogénica vasculares en el embrión que mantienen en estrecha relación tanto en formación de vasos como con las células madre adultas en el músculo esquelético (De Angelis *et al.*, 1999) y que las SP de médula ósea (CD34^{neg}), pueden participar en la formación de miotubos esqueléticos durante la regeneración (Gussoni *et al.*, 1999). Todas estas evidencias refuerzan el papel crucial que el comportamiento de la SP puede jugar en las condiciones experimentales de este estudio. Nuestros resultados serán valiosos para ayudar a interpretar las posibles alteraciones a nivel del propio músculo esquelético que son objeto de estudio en tesis doctorales paralelas.

Si realizamos una recapitulación de los resultados obtenidos y les damos una visión global, podemos afirmar que la hipoxia hipobárica intermitente, cuando es combinada con ejercicio aeróbico ligero, demostró un efecto sostenido en el aumento de progenitores circulantes, siendo estos resultados coherentes con lo que se esperaría de animales ejercitados tras el daño muscular, en donde el ejercicio cumple un rol importante en la reparación del tejido muscular (Clarkson & Tremblay, 1988). También, es importante señalar que la evolución de las células madre circulantes de los grupos experimentales siguió una tendencia diferente a la cinética de las SP a lo largo de todo el periodo de recuperación.

Interesantemente, la cinética de los progenitores con características hematopoyéticas y endoteliales (CD34+/DCV), así como también las células SP CD34^{neg}, no parecen estar relacionadas directamente con el tiempo de muestreo. Se observó que mientras el grupo sometido a hipoxia tuvo el mayor número de SP CD34^{neg} en el primer día tras el daño muscular, especialmente al compararlo con el grupo control, el grupo hipoxia-ejercicio fue quien presentó el incremento más notable de progenitores circulantes sobre el séptimo día post-daño. Estos resultados, expuestos en profundidad en el segundo estudio, sugieren que la hipoxia hipobárica intermitente desencadena principalmente la expansión de células SP CD34^{neg}, llegando a diferenciarse del grupo control tres veces más, sin embargo tendría un menor impacto sobre el conteo de CD34+. Inversamente, al combinar el ejercicio con la hipoxia hipobárica intermitente, se obtuvieron cambios significativos en el número de células circulantes CD34+, pero menores cambios en las células SP analizadas.

Actualmente se conoce que la proteína transportadora ABCG2 tiene un papel fisiológico en la supervivencia de células madre hematopoyéticas en condiciones de hipoxia. La expresión de esta proteína en células madre SP, cumple un rol fundamental al protegerlas en ambientes hipóxicos de la acumulación de porfirina, que causa la muerte mitocondrial. Este tipo de protección va en aumento en la medida que disminuye la cantidad de oxígeno disponible para la células, mientras que la ausencia de ABCG2 hace que las células progenitoras sean altamente sensibles a los cambios de presión de oxígeno (Krishnamurthy *et al.*, 2004b). Además se sabe que ABCG2 incrementa su respuesta en hipoxia, lo que puede explicar por qué las células SP se detectan en niveles tan elevados tan solo con un día de sesión de exposición hipóxica.

Por otra parte, otro factor probablemente implícito en este tipo de respuesta, es el gen ABCB1. Este gen es sensible a la hipoxia y el responsable de la codificación de P-gp (Ueda *et al.*, 1987), un resultado que puede identificarse como una vía de respuesta rápida bajo condiciones de hipoxia (Comerford *et al.*, 2002). Aunque ABCB1 se sobreexpresa en las células CD34+, la hipoxia intermitente no tuvo efectos significativos en el número de células progenitoras de sangre periférica circulante. Sin embargo, los efectos combinados del grupo sometido a hipoxia hipobárica intermitente y ejercicio sugieren que el daño muscular provoca principalmente la movilización de tanto progenitores CD34+/CD45^{neg} como de progenitores CD34+/CD45+.

La pertinencia de estos hallazgos en células que expresan CD34+, se han obtenido a lo largo de varios estudios. El fenotipo celular de progenitores hematopoyéticos CD34+/CD45+, cumplen un importante rol en el proceso de regeneración del tejido muscular esquelético (Sherwood *et al.*, 2004; Abedi *et al.*, 2007b). También la población de progenitores endoteliales CD34+/CD45^{neg}, cumplen una importante función en el proceso de angiogénesis y vascularización durante el mismo proceso de reparación de lesiones (Wagatsuma, 2007a; Ribeiro *et al.*, 2013).

Basado en toda esta evidencia y en el importante rol que cumplen ambos progenitores celulares, se puede postular que la exposición a hipoxia hipobárica intermitente combinada con ejercicio aeróbico ligero, ofrece ventajas significativas en el proceso de recuperación de daño muscular, no solo por el recuento de células progenitoras circulantes CD34+, sino que también por las características celulares de estos progenitores que demuestran poseer características más primitivas dentro de su linaje. Además este tipo condición hipóxica cuentan con el respaldo hemorreológico que demuestra que aunque la viscosidad de la sangre se ve aumentada, parámetros como la elasticidad y el tiempo de relajación compensan esta situación, permitiendo que la combinación de ambos estímulos no afecten de forma notable a la microcirculación y la entrega de oxígeno en la etapa de regeneración muscular.

5. CONCLUSIONES

1. Después de dos semanas de tratamiento, la exposición intermitente a hipoxia hipobárica (altitud simulada), en combinación con ejercicio aeróbico ligero en normoxia (EHYP), muestra parámetros hemorreológicos alterados en comparación a las demás condiciones experimentales.
2. Aunque la respuesta eritropoyética provocada por la exposición hipoxia hipobárica intermitente tiende a aumentar la viscosidad de la sangre en el grupo EHYP, otros parámetros microrreológicos tales como mayor elasticidad y menor tiempo de relajación pueden contribuir a compensar este aumento.
3. Los ajustes compensatorios reológicos pueden considerarse como positivos desde un punto de vista funcional, pues contribuyen a mantener la microcirculación normal y un suministro adecuado de oxígeno, nutrientes y agentes químicos a los tejidos durante su proceso de reparación después de daño sufrido en el músculo esquelético.
4. La tinción DyeCycle Violet se retiene selectivamente para las células CD34+, que permite la discriminación de los dos subconjuntos de células, denominadas internamente como CD34+/DCV^{high} y CD34+/DCV^{low}, debido a una intensidad más brillante o atenuada respectivamente de la tinción DCV.
5. En el séptimo día de la recuperación después de una lesión muscular, el grupo EHYP aumentó claramente el número de progenitores CD34+/CD45^{neg} y CD34+/CD45+.
6. La exposición a hipoxia hipobárica intermitente (HYP) aunque no muestra un aumento en células progenitoras después de la lesión muscular, es altamente sensible a la expresión de células SP las primeras horas de exposición.
7. La exposición a hipoxia hipobárica intermitente parece ser decisiva en la expresión de la población SP, aunque el estímulo inducido por el ejercicio mostró un efecto inverso sobre su cinética. Sin embargo, se necesitan más estudios para aclarar el papel de las células SP en la regeneración muscular.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abedi M, Foster BM, Wood KD, Colvin GA, McLean SD, Johnson KW & Greer DA (2007a). Haematopoietic stem cells participate in muscle regeneration. *British journal of haematology* **138**, 792–801.
- Abedi M, Foster BM, Wood KD, Colvin GA, McLean SD, Johnson KW & Greer DA (2007b). Haematopoietic stem cells participate in muscle regeneration. *British journal of haematology* **138**, 792–801.
- Acosta J (1590). De la opinión que tuvo Aristóteles cerca del Nuevo Mundo, y qué es lo que le engaña para negarle. In *Historia natural y moral de las Indias*.
- Adelman DM, Maltepe E & Simon MC (1999). Multilineage embryonic hematopoiesis requires hypoxic ARNT activity. *Genes & development* **13**, 2478–2483.
- Almendros I, Montserrat JM, Torres M, González C, Navajas D & Farré R (2010). Changes in oxygen partial pressure of brain tissue in an animal model of obstructive apnea. *Respiratory research* **11**, 3.
- Alvi AJ, Clayton H, Joshi C, Enver T, Ashworth A, Vivanco M d M, Dale TC & Smalley MJ (2003). Functional and molecular characterisation of mammary side population cells. *Breast cancer research : BCR* **5**, R1–R8.
- De Angelis L, Berghella L, Coletta M, Lattanzi L, Zanchi M, Cusella-De Angelis MG, Ponzetto C & Cossu G (1999). Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *The Journal of cell biology* **147**, 869–878.
- Arkhipenko Y V, Sazontova TG & Zhukova AG (2005). Adaptation to periodic hypoxia and hyperoxia improves resistance of membrane structures in heart, liver, and brain. *Bulletin of experimental biology and medicine* **140**, 278–281.
- Armstrong RB, Ogilvie RW & Schwane JA (1983). Eccentric Exercise-Induced Injury to Rat Skeletal-Muscle. *Journal of applied physiology* **54**, 80–93.
- Asahara T & Kawamoto A (2004). Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *American journal of physiology Cell physiology* **287**, C572–C579.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G & Isner JM (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science (New York, NY)* **275**, 964–967.
- Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A & Rudnicki MA (2002). Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *Journal of Cell Biology* **159**, 123–134.
- Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A & Owen M (1980). Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clinical orthopaedics and related research* **294–307**.

- Attar EC & Scadden DT (2004). Regulation of hematopoietic stem cell growth. *Leukemia* **18**, 1760–1768.
- Bahlmann FH, DeGroot K, Duckert T, Niemczyk E, Bahlmann E, Boehm SM, Haller H & Fliser D (2003). Endothelial progenitor cell proliferation and differentiation is regulated by erythropoietin. *Kidney international* **64**, 1648–1652.
- Balbuena J, Pachon-Pena G, Lopez-Torrents G, Aran JM, Garcia-Godoy L, Castresana JS & Petriz J (2011). Abcg2 is Required to Control the Sonic Hedgehog Pathway in Side Population Stem-Like Cells. *Cytometry Part B-Clinical Cytometry* **80B**, 399.
- Banchero N (1987). Cardiovascular responses to chronic hypoxia. *Annual review of physiology* **49**, 465–476.
- Barquinero J, Pellicer M & Petriz J (2005). Therapeutic applications of stem-cells. *Medicina clinica* **124**, 504–511.
- Barrera Ramirez LM, Drago Serrano ME, Pérez Ramos J, Sainz Espuñes TDR, Zamora AC, Gómez Arroyo F & Mendoza Pérez F (2004). Citometría de Flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* **17**, 42–55.
- Baskurt OK & Meiselman HJ (2003). Blood rheology and hemodynamics. *Seminars in thrombosis and hemostasis* **29**, 435–450.
- Bateman RM, Sharpe MD & Ellis CG (2003). Bench-to-bedside review: microvascular dysfunction in sepsis--hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide. *Critical care (London, England)* **7**, 359–373.
- Béguin PC, Joyeux-Faure M, Godin-Ribuot D, Lévy P & Ribuot C (2005). Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* **99**, 1064–1069.
- Bernard A & Boumsell L (1984). Human leukocyte differentiation antigens. *Presse médicale (Paris, France : 1983)* **13**, 2311–2316.
- Bishop JJ, Nance PR, Popel AS, Intaglietta M & Johnson PC (2001). Effect of erythrocyte aggregation on velocity profiles in venules. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* **280**, H222–H236.
- Blau HM, Brazelton TR & Weimann JM (2001). The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* **105**, 829–841.
- Boesch M, Reimer D, Rumpold H, Zeimet AG, Sopper S & Wolf D (2012). DyeCycle Violet used for side population detection is a substrate of P-glycoprotein. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **81**, 517–522.

- Bor-Kucukatay M, Colak R, Erken G, Kilic-Toprak E & Kucukatay V (2014). Altitude training induced alterations in erythrocyte rheological properties: A controlled comparison study in rats. *Clinical hemorheology and microcirculation* **58**, 479–488.
- Brusselmans K, Compernelle V, Tjwa M, Wiesener MS, Maxwell PH, Collen D & Carmeliet P (2003). Heterozygous deficiency of hypoxia-inducible factor-2alpha protects mice against pulmonary hypertension and right ventricular dysfunction during prolonged hypoxia. *The Journal of clinical investigation* **111**, 1519–1527.
- Buick FJ, Gledhill N, Froese AB, Spriet L & Meyers EC (1980). Effect of induced erythrocythemia on aerobic work capacity. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* **48**, 636–642.
- Buravkova LB, Andreeva ER, Gogvadze V & Zhivotovsky B (2014). Mesenchymal stem cells and hypoxia: Where are we? *Mitochondrion*; DOI: 10.1016/j.mito.2014.07.005.
- Cahir McFarland ED, Hurley TR, Pingel JT, Sefton BM, Shaw A & Thomas ML (1993). Correlation between Src family member regulation by the protein-tyrosine-phosphatase CD45 and transmembrane signaling through the T-cell receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 1402–1406.
- Carreras A, Almendros I, Acerbi I, Montserrat JM, Navajas D & Farré R (2009). Obstructive apneas induce early release of mesenchymal stem cells into circulating blood. *Sleep* **32**, 117–119.
- Casas M, Casas H, Pages T, Rama R, Ricart A, Ventura JL, Ibanez J, Rodriguez FA & Viscor G (2000). Intermittent hypobaric hypoxia induces altitude acclimation and improves the lactate threshold. *Aviation Space and Environmental Medicine* **71**, 125–130.
- Case J, Mead LE, Bessler WK, Prater D, White HA, Saadatzadeh MR, Bhavsar JR, Yoder MC, Haneline LS & Ingram DA (2007). Human CD34(+)AC133(+)VEGFR-2(+) cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Experimental hematology* **35**, 1109–1118.
- Cavazzana-Calvo M, Lagresle C, André-Schmutz I & Hacein-Bey-Abina S (2004). The bone marrow: a reserve of stem cells able to repair various tissues?. *Annales de biologie clinique* **62**, 131–138.
- Ceradini DJ & Gurtner GC (2005). Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue. *Trends in cardiovascular medicine* **15**, 57–63.
- Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP & Gurtner GC (2004). Progenitor cell

- trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature medicine* **10**, 858–864.
- Chargé SBP & Rudnicki MA (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological reviews* **84**, 209–238.
- Chaudhary P, Mechetner E & Roninson I (1992). Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes [see comments]. *Blood* **80**, 2735–2739.
- Chaudhary PM & Roninson IB (1991). Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* **66**, 85–94.
- Chen Y, Shao J-Z, Xiang L-X, Dong X-J & Zhang G-R (2008). Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *The international journal of biochemistry & cell biology* **40**, 815–820.
- Chien S, King RG, Skalak R, Usami S & Copley AL (1975). Viscoelastic properties of human blood and red cell suspensions. *Biorheology* **12**, 341–346.
- Chien S, Usami S, Dellenba.Rj & Gregerse.Mi (1970). Shear-Dependent Interaction of Plasma Proteins with Erythrocytes in Blood Rheology. *American Journal of Physiology* **219**, 143 – &.
- Chien S, Usami S, Dellenback RJ & Bryant CA (1971). Comparative hemorheology--hematological implications of species differences in blood viscosity. *Biorheology* **8**, 35–57.
- Chizhov AI & Bludov AA (2000). Efficiency of intermittent and resonance intermittent normobaric hypoxia therapy in patients with infection-dependent bronchial asthma. *Vestnik Rossijskoj akademii meditsinskikh nauk / Rossijskaia akademiia meditsinskikh nauk* 48–50.
- Cipolleschi MG, Dello Sbarba P & Olivotto M (1993). The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood* **82**, 2031–2037.
- Clark MR (1988). Senescence of Red Blood-Cells - Progress and Problems. *Physiological Reviews* **68**, 503–554.
- Clarkson PM & Tremblay I (1988). Exercise-induced muscle damage, repair, and adaptation in humans. *J Appl Physiol* **65**, 1–6.
- Collino CJG, Rodríguez C, Sastre D, Heller V & Fernández E (2006). Utilización estratégica de CD45 en la identificación de células blásticas por citometría de flujo. *Acta bioquímica clínica latinoamericana* **40**, 173–180.
- Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, Gene MDR, Louis NA, Montalto MC & Colgan SP (2002). Hypoxia-inducible Factor-1-dependent Regulation of the Multidrug Resistance (MDR1) Gene Hypoxia-inducible Factor-1-dependent Regulation of the Multidrug Resistance. *Cancer Research* **62**, 3387–3394.

- Connes P, Pichon A, Hardy-Dessources M-D, Waltz X, Lamarre Y, Simmonds MJ & Tripette J (2012). Blood viscosity and hemodynamics during exercise. *Clinical hemorheology and microcirculation* **51**, 101–109.
- Crameri RM, Aagaard P, Qvortrup K, Langberg H, Olesen J & Kjaer M (2007). Myofibre damage in human skeletal muscle: effects of electrical stimulation versus voluntary contraction. *Journal of Physiology-London* **583**, 365–380.
- Dahlke MH, Larsen SR, Rasko JEJ & Schlitt HJ (2004). The biology of CD45 and its use as a therapeutic target. *Leukemia & lymphoma* **45**, 229–236.
- Daley GQ, Goodell MA & Snyder EY (2003). Realistic prospects for stem cell therapeutics. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program* 398–418.
- Dausset J, Fonseca A & Brexvi H (1958). Technic of preparation and transfusion of blood deprived of leukocytes. *Le Sang* **29**, 78–81.
- Desbaillets I, Ziegler U, Groscurth P & Gassmann M (2000). Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis. *Experimental physiology* **85**, 645–651.
- Dintenfass L (1971). The rheology of blood in vascular disease. *Journal of the Royal College of Physicians of London* **5**, 231–240.
- Donenko Y (1992). Comparison of intermittent normobaric hypoxic therapy and hypobaric therapy in treatment of chronic nonspecific lung diseases. In *Intermittent Hypoxic Training- Effectiveness and Mechanisms of Action*, pp. 65–68. Kiev.
- Dong JW, Zhu HF, Zhu WZ, Ding HL, Ma TM & Zhou ZN (2003). Intermittent hypoxia attenuates ischemia/reperfusion induced apoptosis in cardiac myocytes via regulating Bcl-2/Bax expression. *Cell research* **13**, 385–391.
- Dorantes-Acosta E, Chávez-González A, Santos JI, Medina-Sanson A & Mayani H (2008). Defective in vitro growth of primitive hematopoietic cells from pediatric patients with acute myeloid leukemia. *Pediatric blood & cancer* **51**, 741–746.
- Dormandy J (1988). Ed. Proceedings of the Second Workshop Held in London. Marinus Nijhoff Publisher, The Hague.
- Dubinska-Magiera M, Zaremba-Czogalla M & Rzepecki R (2013). Muscle development, regeneration and laminopathies: how lamins or lamina-associated proteins can contribute to muscle development, regeneration and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* **70**, 2713–2741.
- Eaker SS, Hawley TS, Ramezani A & Hawley RG (2004). Detection and enrichment of hematopoietic stem cells by side population phenotype. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **263**, 161–180.

- Eklom B, Goldberg AN & Gullbring B (1972). Response to exercise after blood loss and reinfusion. *Journal of applied physiology* **33**, 175–180.
- Eliasson P & Jonsson J-I (2010). The Hematopoietic Stem Cell Niche: Low in Oxygen but a Nice Place to be. *Journal of cellular physiology* **222**, 17–22.
- Esteva S, Panisello P, Torrella JR, Pages T & Viscor G (2009a). Blood Rheology Adjustments in Rats after a Program of Intermittent Exposure to Hypobaric Hypoxia. *High altitude medicine & biology* **10**, 275–281.
- Esteva S, Panisello P, Torrella JR, Pagés T & Viscor G (2009b). Blood rheology adjustments in rats after a program of intermittent exposure to hypobaric hypoxia. *High altitude medicine & biology* **10**, 275–281.
- Ezoe S, Matsumura I, Satoh Y, Tanaka H & Kanakura Y (2004). Cell cycle regulation in hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **3**, 314–318.
- Facultad de Biotecnología y Biología Celular (n.d.). *Ley de Newton de la Viscosidad*. Bogotá.
- Faiss R, Leger B, Vesin J-M, Fournier P-E, Eggel Y, Deriaz O & Millet GP (2013). Significant Molecular and Systemic Adaptations after Repeated Sprint Training in Hypoxia. *Plos One* **8**, e56522.
- Fandrey J (2004). Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* **286**, R977–R988.
- Farias JG, Osorio J, Soto G, Brito J, Siques P & Reyes JG (2006). Sustained acclimatization in Chilean mine workers subjected to chronic intermittent hypoxia. *High altitude medicine & biology* **7**, 302–306.
- FEH-lab (2014). *RRN Manual*. Juan Gabriel Ríos Kristjánsson; David Rizo Roca; Cristian Andrés Núñez Espinosa, Barcelona.
- Fiebig H, Behn I, Gruhn R, Typlt H, Kupper H & Ambrosius H (1984). Characterization of a series of monoclonal antibodies against human T cells. *Allergie und Immunologie* **30**, 242–250.
- Fornas O, Garcia J & Petriz J (2000). Flow cytometry counting of CD34+ cells in whole blood. *Nature medicine* **6**, 833–836.
- Fradette C & Du Souich P (2004). Effect of hypoxia on cytochrome P450 activity and expression. *Current drug metabolism* **5**, 257–271.
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK & Lalykina KS (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics* **3**, 393–403.

- Friedenstein AJ, Ivanov-Smolenski AA, Chajlakjan RK, Gorskaya UF, Kuralesova AI, Latzinik NW & Gerasimow UW (1978). Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants. *Experimental hematology* **6**, 440–444.
- Friedenstein AJ, Petrakova K V, Kurolesova AI & Frolova GP (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* **6**, 230–247.
- Fritsch G, Printz D, Stimpfl M, Dworzak MN, Witt V, Pötschger U & Buchinger P (1997). Quantification of CD34+ cells: comparison of methods. *Transfusion* **37**, 775–784.
- Fuchs E & Segre JA (2000). Stem cells: a new lease on life. *Cell* **100**, 143–155.
- Fujimaki S, Machida M, Hidaka R, Asashima M, Takemasa T & Kuwabara T (2013). Intrinsic Ability of Adult Stem Cell in Skeletal Muscle: An Effective and Replenishable Resource to the Establishment of Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells International*; DOI: 10.1155/2013/420164.
- Fukada E & Kaibara M (1980). Viscoelastic study of aggregation of red blood cells. *Biorheology* **17**, 177–182.
- Furness SGB & McNagny K (2006). Beyond mere markers - Functions for CD34 family of sialomucins in hematopoiesis. *Immunologic research* **34**, 13–32.
- Gallagher SA & Hackett PH (2004). High-altitude illness. *Emergency medicine clinics of North America* **22**, 329–355, viii.
- Gelin LE (1961). Disturbance of the flow properties of blood and its counteraction in surgery. *Acta chirurgica Scandinavica* **122**, 287–293.
- Giaccia AJ, Simon MC & Johnson R (2004). The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes & development* **18**, 2183–2194.
- Gippenreiter E & West JB (1996). High altitude medicine and physiology in the former Soviet Union. *Aviation, space, and environmental medicine* **67**, 576–584.
- Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G & Lehn P (1989). Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *The New England journal of medicine* **321**, 1174–1178.
- Gomillion CT & Burg KJL (2006). Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials* **27**, 6052–6063.
- Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS & Mulligan RC (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *Journal of Experimental Medicine* **183**, 1797–1806.

- Gore CJ & Hopkins WG (2005). Counterpoint: positive effects of intermittent hypoxia (live high:train low) on exercise performance are not mediated primarily by augmented red cell volume. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* **99**, 2055–2057; discussion 2057–2058.
- Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GAJ, Guthrie SM, Mames RN, Byrne BJ, Vaught T, Spoerri PE, Peck AB & Scott EW (2002). Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nature medicine* **8**, 607–612.
- Grayson WL, Zhao F, Bunnell B & Ma T (2007). Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* **358**, 948–953.
- Guleria A, Kumar U, Kishan SSK & Khetrapal CL (2013). Effect of “SOHAM” meditation on the human brain: An fMRI study. *Psychiatry research* **214**, 462–465.
- Gunsilius E, Gastl G & Petzer AL (2001). Hematopoietic stem cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie* **55**, 186–194.
- Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM & Mulligan RC (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* **401**, 390–394.
- Guyton A, Jones C & Coleman T (1973). *Cardiac Output and its regulation*, 2nd editio.ed. Saunders. Philadelphia.
- Hackett PH & Roach RC (1987). Medical therapy of altitude illness. *Annals of emergency medicine* **16**, 980–986.
- Hamlin SK & Benedik PS (2014). Basic concepts of hemorheology in microvascular hemodynamics. *Critical care nursing clinics of North America* **26**, 337–344.
- Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM & Caplan AI (1992). Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* **13**, 81–88.
- He Q, Wan C & Li G (2007). Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **25**, 69–77.
- 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. *European journal of applied physiology* **88**, 535–543.
- Hendrickx A & Bossuyt X (2001). Quantification of the leukocyte common antigen (CD45) in mature B-cell malignancies. *Cytometry* **46**, 336–339.
- Hernandez P & Dorticós E (2004). Medicina regenerativa. Celulas madre embrionarias y adultas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*.

- Hoetzer GL, Van Guilder GP, Irmiger HM, Keith RS, Stauffer BL & DeSouza CA (2007). Aging, exercise, and endothelial progenitor cell clonogenic and migratory capacity in men. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* **102**, 847–852.
- Holleman D, Budka H, Löscher WN, Yanagida G, Fischer MB & Wanschitz J V (2008). Endothelial and myogenic differentiation of hematopoietic progenitor cells in inflammatory myopathies. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **67**, 711–719.
- Hoppeler H & Vogt M (2001). Muscle tissue adaptations to hypoxia. *Journal of Experimental Biology* **204**, 3133–3139.
- Huang CR, Siskovic N, Robertson RW, Fabisiak W, Smitherberg EH & Copley AL (1975). Quantitative characterization of thixotropy of whole human blood. *Biorheology* **12**, 279–282.
- Hwang JH, Yuk SH, Lee JH, Lyoo WS, Ghil SH, Lee SS, Khang IG, Paik SY & Lee JY (2004). Differentiation of stem cells isolated from rat smooth muscle. *Molecules and cells* **17**, 57–61.
- Invitrogen (2006). Manual Vybrant DyeCycle Violet Stain. Catalog no. V35003. 1–4. Available at: <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp35003.pdf>.
- Ivanović Z, Bartolozzi B, Bernabei PA, Cipolleschi MG, Rovida E, Milenković P, Praloran V & Dello Sbarba P (2000). Incubation of murine bone marrow cells in hypoxia ensures the maintenance of marrow-repopulating ability together with the expansion of committed progenitors. *British journal of haematology* **108**, 424–429.
- Ivashkevich AA & Serebrovskaya T V (2000). Scientific activities of Academician Nikolai Sirotinin. *High altitude medicine & biology* **1**, 75–80.
- Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda H, Hayashi S, Silver M, Li T, Isner JM & Asahara T (2002). Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation* **105**, 732–738.
- Jackson KA, Mi T & Goodell MA (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 14482–14486.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA & Verfaillie CM (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**, 41–49.
- Johnson PC (1971). Red cell separation in the mesenteric capillary network. *The American journal of physiology* **221**, 99–104.

- Kardon G, Campbell JK & Tabin CJ (2002). Local extrinsic signals determine muscle and endothelial cell fate and patterning in the vertebrate limb. *Developmental cell* **3**, 533–545.
- Kawada H & Ogawa M (2001). Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle. *Blood* **98**, 2008–2013.
- Kayar SR & Banchemo N (1985). Myocardial capillarity in acclimation to hypoxia. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* **404**, 319–325.
- Kellogg RH (1978). “La Pression barométrique”: Paul Bert’s hypoxia theory and its critics. *Respiration physiology* **34**, 1–28.
- Koç ON & Lazarus HM (2001). Mesenchymal stem cells: heading into the clinic. *Bone marrow transplantation* **27**, 235–239.
- Kolesnikova EE, Safronova OS & Serebrovskaya T V (2003). Age-related peculiarities of breathing regulation and antioxidant enzymes under intermittent hypoxic training. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* **54 Suppl 1**, 20–24.
- Kolesnikova EE & Serebrovskaya T V (2009). Parkinson’s Disease and Intermittent Hypoxia Training. In *Intermittent Hypoxia: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications*, ed. Xi L & Serebrovskaya T V, pp. 549–560. Nova Science Publishers.
- Komulainen J, Kytölä J & Vihko V (1994). Running-induced muscle injury and myocellular enzyme release in rats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* **77**, 2299–2304.
- Kørbling M & Estrov Z (2003). Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *The New England journal of medicine* **349**, 570–582.
- Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S & Sharkis SJ (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* **105**, 369–377.
- Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, Bailey-Dell K, Zhou S, Mercer KE, Sarkadi B, Sorrentino BP & Schuetz JD (2004a). The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *The Journal of biological chemistry* **279**, 24218–24225.
- Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, Bailey-Dell K, Zhou S, Mercer KE, Sarkadi B, Sorrentino BP & Schuetz JD (2004b). The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 24218–24225.
- Krogh A, Harrop GA & Rehberg PB (1922). Studies on the physiology of capillaries: III. The innervation of the blood vessels in the hind legs of the frog. *The Journal of physiology* **56**, 179–189.

- Kulberg Ay (1997). *Regulation of the Immune Response*, Medicine. Moscow.
- Kurosaka M, Naito H, Ogura Y, Machida S & Katamoto S (2012). Satellite cell pool enhancement in rat plantaris muscle by endurance training depends on intensity rather than duration. *Acta Physiologica* **205**, 159–166.
- Lapan AD, Rozkalne A & Gussoni E (2012). Human fetal skeletal muscle contains a myogenic side population that expresses the melanoma cell-adhesion molecule. *Human molecular genetics* **21**, 3668–3680.
- Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, Miche E, Bohm M & Nickenig G (2004). Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* **109**, 220–226.
- Leon-Velarde F, Gamboa A, Chuquiza JA, Esteba WA, Rivera-Chira M & Monge CC (2000). Hematological parameters in high altitude residents living at 4,355, 4,660, and 5,500 meters above sea level. *High altitude medicine & biology* **1**, 97–104.
- León-Velarde F, Maggiorini M, Reeves JT, Aldashev A, Asmus I, Bernardi L, Ge R-L, Hackett P, Kobayashi T, Moore LG, Penaloza D, Richalet J-P, Roach R, Wu T, Vargas E, Zubieta-Castillo G & Zubieta-Calleja G (2005). Consensus statement on chronic and subacute high altitude diseases. *High altitude medicine & biology* **6**, 147–157.
- 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. *Journal of comparative physiology B, Biochemical, systemic, and environmental physiology* **163**, 52–58.
- Leslie EM, Deeley RG & Cole SPC (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and applied pharmacology* **204**, 216–237.
- Lin AMY, Chen CF & Ho LT (2002). Neuroprotective effect of intermittent hypoxia on iron-induced oxidative injury in rat brain. *Experimental neurology* **176**, 328–335.
- Lipowsky HH, Usami S & Chien S (1980). In vivo measurements of “apparent viscosity” and microvessel hematocrit in the mesentery of the cat. *Microvascular research* **19**, 297–319.
- Liu L, Yu Q, Lin J, Lai X, Cao W, Du K, Wang Y, Wu K, Hu Y, Zhang L, Xiao H, Duan Y & Huang H (2011). Hypoxia-inducible factor-1 α is essential for hypoxia-induced mesenchymal stem cell mobilization into the peripheral blood. *Stem cells and development* **20**, 1961–1971.
- Lopez Moratalla N (2003). La racionalidad terapeutica en la medicina regenerativa con celulas troncales embrionarias o de adulto. *Anal Real Acad Nal Farm* **69**, 21–45.
- Lorenti AS (2001). [Hepatic stem cells]. *Medicina* **61**, 614–620.

- Lowe GDO (1988). Nature and clinical importance of blood rheology: clinical blood rheology. In *Clinical Blood Rheology, Vol.1*, CRC Press., ed. Lowe GDO, pp. 1–10. Boca Ration Florida.
- Lowe GDO & Barbenel JC (1988). Plasma and blood viscosity. In *Clinical Blood Rheology, Vol .1*, CRC Press., ed. Lowe GDO, pp. 11–44. Boca Ration Florida.
- Maggiorini M (2003). Cardio-pulmonary interactions at high altitude. Pulmonary hypertension as a common denominator. *Advances in experimental medicine and biology* **543**, 177–189.
- Mallet RT, Ryou M-G, Williams AG, Howard L & Downey HF (2006). Beta1-Adrenergic receptor antagonism abrogates cardioprotective effects of intermittent hypoxia. *Basic research in cardiology* **101**, 436–446.
- Mancuso P, Peccatori F, Rocca A, Calleri A, Antoniotti P, Rabascio C, Saronni L, Zorzino L, Sandri MT, Zubani A & Bertolini F (2008). Circulating endothelial cell number and viability are reduced by exposure to high altitude. *Endothelium- Journal of Endothelial Cell Research* **15**, 53–58.
- Manukhina EB, Belkina LM, Terekhina OL, Abramochkin D V, Smirnova EA, Budanova OP, Mallet RT & Downey HF (2013). Normobaric, intermittent hypoxia conditioning is cardio- and vasoprotective in rats. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)* **238**, 1413–1420.
- Manukhina EB, Jasti D, Vanin AF & Downey HF (2011). Intermittent hypoxia conditioning prevents endothelial dysfunction and improves nitric oxide storage in spontaneously hypertensive rats. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)* **236**, 867–873.
- Martin GR & Evans MJ (1975). Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**, 1441–1445.
- Maruyama N, Kokubo K, Shinbo T, Hirose M, Kobayashi M, Sakuragawa N & Kobayashi H (2013). Hypoxia enhances the induction of human amniotic mesenchymal side population cells into vascular endothelial lineage. *International journal of molecular medicine* **32**, 315–322.
- Matsuda T & Murakami M (1976). Relationship between fibrinogen and blood viscosity. *Thrombosis research* **8**, 25–33.
- Mauro A (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* **9**, 493–495.
- McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DI & Choi DW (1999). Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nature medicine* **5**, 1410–1412.

- Mchedlishvili G (1998). Disturbed blood flow structuring as critical factor of hemorheological disorders in microcirculation. *Clinical hemorheology and microcirculation* **19**, 315–325.
- McKenzie JL, Takenaka K, Gan OI, Doedens M & Dick JE (2007). Low rhodamine 123 retention identifies long-term human hematopoietic stem cells within the Lin-CD34+CD38- population. *Blood* **109**, 543–545.
- McKinsey TA, Zhang CL & Olson EN (2001). Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Current opinion in genetics & development* **11**, 497–504.
- Méndez-Ferrer S, Michurina T V, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN & Frenette PS (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* **466**, 829–834.
- Merrill EW, Cheng CS & Pelletier GA (1969). Yield stress of normal human blood as a function of endogenous fibrinogen. *Journal of applied physiology* **26**, 1–3.
- Merrill EW, Cokelet GC, Britten A & Wells RE (1963). Non-Newtonian rheology of human blood-effect of fibrinogen deduced by “Subtraction.” *Circulation research* **13**, 48–55.
- Metcalf D (1985). The granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Science* **229**, 16–22.
- Milano G, Corno AF, Lippa S, Von Segesser LK & Samaja M (2002). Chronic and intermittent hypoxia induce different degrees of myocardial tolerance to hypoxia-induced dysfunction. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)* **227**, 389–397.
- Millet GP, Roels B, Schmitt L, Woorons X & Richalet JP (2010). Combining hypoxic methods for peak performance. *Sports medicine (Auckland, NZ)* **40**, 1–25.
- Mina M & Braut A (2004). New insight into progenitor/stem cells in dental pulp using Col1a1-GFP transgenes. *Cells, tissues, organs* **176**, 120–133.
- Ministerio de Empleo y Seguridad Social G de E (2014). Anuario de Estadísticas del Ministerio de Empleo y Seguridad Social 2013. ; DOI: NIPO: 270-14-004-7.
- Moggi L (2011). Hemorreología y microcirculación. *Revista argentina de anestesiología* **69**, 61–84.
- Monge CC & León-Velarde F (2003). El Reto Fisiológico de Vivir en los Andes. In, ed. Travaux del Institut Francais d'Etudes Andines (IFEA) & Heredia UPC, p. 435. IFEA/UPCH, Lima.

- Morris RJ, Liu Y, Marles L, Yang Z, Trempus C, Li S, Lin JS, Sawicki JA & Cotsarelis G (2004). Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nature biotechnology* **22**, 411–417.
- Muhm JM, Rock PB, McMullin DL, Jones SP, Lu IL, Eilers KD, Space DR & McMullen A (2007). Effect of aircraft-cabin altitude on passenger discomfort. *The New England journal of medicine* **357**, 18–27.
- Murasawa S & Asahara T (2005). Endothelial progenitor cells for vasculogenesis. *Physiology (Bethesda, Md)* **20**, 36–42.
- Nash GB & Meiselman HJ (1985). Alteration of red cell membrane viscoelasticity by heat treatment: effect on cell deformability and suspension viscosity. *Biorheology* **22**, 73–84.
- Nielsen JS & McNagny KM (2008). Novel functions of the CD34 family. *Journal of cell science* **121**, 3683–3692.
- Niermeyer S, Zamudio S & Moorfe L (2001). The People. In: High Altitude: An Exploration of Human Adaptation. In, ed. Hombein T & Schoene R, pp. 43–100. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Niesler CU (2004). Old dogmas and new hearts: a role for adult stem cells in cardiac repair? *Cardiovascular journal of South Africa : official journal for Southern Africa Cardiac Society [and] South African Society of Cardiac Practitioners* **15**, 184–189; discussion 189.
- Nikolsky I & Serebrovska T V (2009). Role of hypoxia in stem cell development and functioning. *Fiziolohichnyi zhurnal (Kiev, Ukraine : 1994)* **55**, 116–130.
- Oertel M & Shafritz DA (2008). Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochimica et biophysica acta* **1782**, 61–74.
- Orlic D, Hill JM & Arai AE (2002). Stem cells for myocardial regeneration. *Circulation research* **91**, 1092–1102.
- Owen M & Friedenstein AJ (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Foundation symposium* **136**, 42–60.
- Panisello P, Torrella JR, Esteva S, Pages T & Viscor G (2008). Capillary supply, fibre types and fibre morphometry in rat tibialis anterior and diaphragm muscles after intermittent exposure to hypobaric hypoxia. *European journal of applied physiology* **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 altitude medicine & biology* **8**, 322–330.

- Parks DR & Herzenberg LA (1984). Fluorescence-activated cell sorting: theory, experimental optimization, and applications in lymphoid cell biology. *Methods in enzymology* **108**, 197–241.
- Parmar K, Mauch P, Vergilio J-A, Sackstein R & Down JD (2007). Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 5431–5436.
- Petersen BE (2001). Hepatic “stem” cells: coming full circle. *Blood cells, molecules & diseases* **27**, 590–600.
- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS & Goff JP (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science (New York, NY)* **284**, 1168–1170.
- Petritz J (2013). Flow cytometry of the side population (SP). *Current protocols in cytometry / editorial board, JPaul Robinson, managing editor .[et al]* **Chapter 9**, Unit9.23–Unit9.23.
- Pichon A, Connes P, Quidu P, Merchant D, Brunet J, Levy BI, Vilar J, Safeukui I, Cymbalista F, Maignan M, Richalet J-P & Favret F (2012). Acetazolamide and chronic hypoxia: effects on haemorheology and pulmonary haemodynamics. *European Respiratory Journal* **40**, 1401–1409.
- Piersma AH, Ploemacher RE & Brockbank KG (1983). Transplantation of bone marrow fibroblastoid stromal cells in mice via the intravenous route. *British journal of haematology* **54**, 285–290.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S & Marshak DR (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, NY)* **284**, 143–147.
- Polli EE (2000). Transplanting bone-marrow stem cells in the central nervous system. *Haematologica* **85**, 1009–1010.
- Pomidori L, Bonardi D, Campigotto F, Fasano V, Gennari A, Valli G, Palange P & Cogo A (2009). The hypoxic profile during trekking to the Pyramid Laboratory. *High altitude medicine & biology* **10**, 233–237.
- Popel AS & Johnson PC (2005). Microcirculation and Hemorheology. *Annual review of fluid mechanics* **37**, 43–69.
- Prosper F & Verfaillie C (2003). Celulas madres adultas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* **26**, 345–356.
- Prósper F & Verfaillie C (2008). Células madre adultas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* **26**, 345–356.

- Prothero J & Burton AC (1961). The physics of blood flow in capillaries. I. The nature of the motion. *Biophysical journal* **1**, 565–579.
- Provot S & Schipani E (2007). Fetal growth plate: a developmental model of cellular adaptation to hypoxia. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1117**, 26–39.
- Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A & Anversa P (2002). Chimerism of the transplanted heart. *The New England journal of medicine* **346**, 5–15.
- Radziewski P & Radziewska M (2009). Use of Intermittent Hypoxic Training in Different Sports. In *Intermittent Hypoxia: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications*, ed. Xi L & Serebrovskaya T V, pp. 473–485. Nova Science Publishers.
- Rafii S & Lyden D (2003a). Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nature medicine* **9**, 702–712.
- Rafii S & Lyden D (2003b). Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nature medicine* **9**, 702–712.
- Ramírez-Bergeron DL, Runge A, Dahl KDC, Fehling HJ, Keller G & Simon MC (2004). Hypoxia affects mesoderm and enhances hemangioblast specification during early development. *Development (Cambridge, England)* **131**, 4623–4634.
- Rampling MW (1988). Red cell aggregation and yield stress. In *Clinical Blood Rheology, Vol. 1*, CRC Press., ed. G. D. O. Lowe, pp. 65–86. Boca Ration Florida.
- Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH & Verfaillie CM (2002). Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *The Journal of clinical investigation* **109**, 337–346.
- Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L & Verfaillie C (2001). Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. 2001;98:2615-2625. *Blood* **98**, 2615–2625.
- Reynafarje C & Hurtado A (1971). Adaptation to high altitude. *The New England journal of medicine* **285**, 862.
- Ribeiro F, Ribeiro IP, Alves AJ, do Ceu Monteiro M, Oliveira NL, Oliveira J, Amado F, Remiao F & Duarte JA (2013). Effects of exercise training on endothelial progenitor cells in cardiovascular disease: a systematic review. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation / Association of Academic Physiatrists* **92**, 1020–1030.
- Ricart A, Casas H, Casas M, Pages T, Palacios L, Rama R, Rodriguez FA, Viscor G & Ventura JL (2000). Acclimatization near home? Early respiratory changes after short-term intermittent exposure to simulated altitude. *Wilderness & environmental medicine* **11**, 84–88.

- Richalet JP, Bittel J, Herry JP, Savourey G, Le Trong JL, Auvert JF & Janin C (1992). Use of a hypobaric chamber for pre-acclimatization before climbing Mount Everest. *International journal of sports medicine* **13 Suppl 1**, S216–S220.
- Richalet JP, Donoso M V, Jimenez D, Antezana AM, Hudson C, Cortes G, Osorio J & Leon A (2002). Chilean miners commuting from sea level to 4500 m: A prospective study. *High altitude medicine & biology*.
- Rivier F, Alkan O, Flint AF, Muskiewicz K, Allen PD, Le Boulch P & Gussoni E (2004). Role of bone marrow cell trafficking in replenishing skeletal muscle SP and MP cell populations. *Journal of cell science* **117**, 1979–1988.
- Rocheffort GY, Delorme B, Lopez A, Héroult O, Bonnet P, Charbord P, Eder V & Domenech J (2006). Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **24**, 2202–2208.
- Rodríguez FA, Casas H, Casas M, Pagés T, Rama R, Ricart A, Ventura JL, Ibáñez J & Viscor G (1999). Intermittent hypobaric hypoxia stimulates erythropoiesis and improves aerobic capacity. *Medicine and science in sports and exercise* **31**, 264–268.
- Roels B, Bentley DJ, Coste O, Mercier J & Millet GP (2007). Effects of intermittent hypoxic training on cycling performance in well-trained athletes. *European journal of applied physiology* **101**, 359–368.
- Rose MS, Houston CS, Fulco CS, Coates G, Sutton JR & Cymerman A (1988). Operation Everest. II: Nutrition and body composition. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* **65**, 2545–2551.
- Rosenthal N (2003). Prometheus's vulture and the stem-cell promise. *The New England journal of medicine* **349**, 267–274.
- Rovel A, Streiff F & Vigneron C (1979). In vitro influence of albumin, gammaglobulin and fibrinogen on the sedimentation rate and the rheological behaviour of the red cell. *Annales de biologie clinique* **37**, 201–205.
- Salem HK & Thiemermann C (2010). Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **28**, 585–596.
- Salgado Lynn M (2002). *Citometria de flujo: Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)*. Ciudad de México, Distrito Federal.
- Samuels MP (2004). The effects of flight and altitude. *Archives of disease in childhood* **89**, 448–455.
- Sarradell J, Rondelli FM, Hrdalo JC, Fiorentini J, Gollan A, Molinari C, Ibarгойen G, D'Espósito R, Pietronave V, Belá M, Schiaffi A, Rinaudo A, Sacchi L, Pagni C & Fain Binda JC (2010). Células ovals en el hígado de ratas con lesiones quirúrgicas severas. *InVet* **12**, 19–24.

- Sarto P et al. (2007). Effects of exercise training on endothelial progenitor cells in patients with chronic heart failure. *Journal of cardiac failure* **13**, 701–708.
- Sazontova TG, Glazachev OS, Bolotova A V, Dudnik EN, Striapko N V, Bedareva I V, Anchishkina NA & Arkhipenko I V (2012). [Adaptation to hypoxia and hyperoxia improves physical endurance: the role of reactive oxygen species and redox-signaling]. *Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal imeni IM Sechenova / Rossiiskaia akademiia nauk* **98**, 793–807.
- Scharenberg CW, Harkey MA & Torok-Storb B (2002). The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* **99**, 507–512.
- Schoene RB, Swenson ER, Pizzo CJ, Hackett PH, Roach RC, Mills WJ, Henderson WR & Martin TR (1988). The lung at high altitude: bronchoalveolar lavage in acute mountain sickness and pulmonary edema. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* **64**, 2605–2613.
- Schultz SS, Abraham S & Lucas PA (n.d.). Stem cells isolated from adult rat muscle differentiate across all three dermal lineages. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* **14**, 224–231.
- Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu W-S & Verfaillie CM (2002). Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *The Journal of clinical investigation* **109**, 1291–1302.
- Scott-Blair GW (1969). [The rheologic properties of food products]. *Annales de la nutrition et de l'alimentation* **23**, 79–93.
- Seale P & Rudnicki MA (2000). A new look at the origin, function, and “stem-cell” status of muscle satellite cells. *Developmental biology* **218**, 115–124.
- Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P & Rudnicki MA (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* **102**, 777–786.
- Semenza GL (1999). Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annual review of cell and developmental biology* **15**, 551–578.
- Semenza GL (2000). HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* **88**, 1474–1480.
- Semenza GL (2004). O₂-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* **96**, 1173–1177; discussion 1170–1172.

- Semenza GL, Shimoda LA & Prabhakar NR (2006). Regulation of gene expression by HIF-1. *Novartis Foundation symposium* **272**, 2–14,33–36.
- Senturk UK, Gunduz F, Kuru O, Aktekin MR, Kipmen D, Yalcin O, Bor-Kucukatay M, Yesilkaya A & Baskurt OK (2001). Exercise-induced oxidative stress affects erythrocytes in sedentary rats but not exercise-trained rats. *Journal of applied physiology* **91**, 1999–2004.
- Serebrovskaya T V, Nikolsky S, Nikolska V V, Mallet RT & Ishchuk VA (2011). Intermittent Hypoxia Mobilizes Hematopoietic Progenitors and Augments Cellular and Humoral Elements of Innate Immunity in Adult Men. *High altitude medicine & biology* **12**, 243–252.
- Serebrovskaya T V, Swanson RJ & Kolesnikova EE (2003). Intermittent hypoxia: mechanisms of action and some applications to bronchial asthma treatment. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* **54 Suppl 1**, 35–41.
- Shah VO, Civin CI & Loken MR (1988). Flow cytometric analysis of human bone marrow. IV. Differential quantitative expression of T-200 common leukocyte antigen during normal hemopoiesis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **140**, 1861–1867.
- Shapiro HM (2003). *Practical Flow Cytometry*, 4th ed New. Wiley-Liss, Hoboken.
- Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL & Wagers AJ (2004). Determinants of skeletal muscle contributions from circulating cells, bone marrow cells, and hematopoietic stem cells. *Stem cells* **22**, 1292–1304.
- Shihabuddin LS, Palmer TD & Gage FH (1999). The search for neural progenitor cells: prospects for the therapy of neurodegenerative disease. *Molecular medicine today* **5**, 474–480.
- Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS & Hopkinson A (2014). Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **32**, 1380–1389.
- Sirén AL & Ehrenreich H (2001). Erythropoietin--a novel concept for neuroprotection. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* **251**, 179–184.
- Sirotinin N. (1940). Effect of acclimatization to high mountain climates on adaptation to decreased atmospheric pressure in decompression chambers. *Arkh Pat Anat Pat Physiol* **6**, 35–42.
- Sirotinin NN (1963). Comparative physiology of acclimatization to high mountains. In *In Oxygen Deficiency*, Naukova Du., pp. 3–13. Kiev.
- Smith HK, Maxwell L, Rodgers CD, McKee NH & Plyley MJ (2001). Exercise-enhanced satellite cell proliferation and new myonuclear accretion in rat skeletal muscle. *Journal of applied physiology* **90**, 1407–1414.

- Stella CC, Cazzola M, De Fabritiis P, De Vincentiis A, Gianni AM, Lanza F, Lauria F, Lemoli RM, Tarella C & Zanon P (n.d.). CD34-positive cells: biology and clinical relevance. *Haematologica* **80**, 367–387.
- Streltsov VV (1939). Physiological validation of decompression chamber training for high altitude flights. 18.
- Stuart J (1988). Erythrocyte deformability. In *Clinical Blood Rheology, Vol. I*, Boca Ratio., ed. Lowe GDO, pp. 65–86.
- Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R & Chin-Yee I (1996). The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *Journal of hematotherapy* **5**, 213–226.
- Tekin D, Dursun AD, Baştuğ M, Karaorman G & Fıçıcılar H (2011). The effects of acute and intermittent hypoxia on the expressions of HIF-1 α and VEGF in the left and right ventricles of the rabbit heart. *Anadolu kardiyoloji dergisi : AKD = the Anatolian journal of cardiology* **11**, 379–385.
- Tekin D, Dursun AD & Xi L (2010). Hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) and cardioprotection. *Acta pharmacologica Sinica* **31**, 1085–1094.
- Telford WG (2013). Stem cell identification by DyeCycle Violet side population analysis. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **946**, 163–179.
- Telford WG, Bradford J, Godfrey W, Robey RW & Bates SE (2007). Side population analysis using a violet-excited cell-permeable DNA binding dye. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **25**, 1029–1036.
- Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM & Krause DS (2000a). Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology (Baltimore, Md)* **31**, 235–240.
- Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O & Krause DS (2000b). Liver from bone marrow in humans. *Hepatology (Baltimore, Md)* **32**, 11–16.
- Theiss HD, Adam M, Greie S, Schobersberger W, Humpeler E & Franz W-M (2008). Increased levels of circulating progenitor cells after 1-week sojourn at moderate altitude (Austrian Moderate Altitude Study II, AMAS II). *Respiratory Physiology & Neurobiology* **160**, 232–238.
- Thomas ED, Lochte HL, Lu WC & Ferrebee JW (1957). Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *The New England journal of medicine* **257**, 491–496.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS & Jones JM (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, NY)* **282**, 1145–1147.

- Thurston GB (1972). Viscoelasticity of human blood. *Biophysical journal* **12**, 1205–1217.
- Thurston GB (1979). Rheological Parameters for the Viscosity Viscoelasticity and Thixotropy of Blood. *Biorheology* **16**, 149–162.
- Thurston GB (1989). Plasma Release-Cell Layering Theory for Blood-Flow. *Biorheology* **26**, 199–214.
- Thurston GB (1990). Light Transmission through Blood in Oscillatory Flow. *Biorheology* **27**, 685–700.
- Thurston GB, Henderson NM & Jeng M (2004). Effects of erythrocytapheresis transfusion on the viscoelasticity of sickle cell blood. *Clinical hemorheology and microcirculation* **30**, 83–97.
- Timmermans F, Van Hauwermeiren F, De Smedt M, Raedt R, Plasschaert F, De Buyzere ML, Gillebert TC, Plum J & Vandekerckhove B (2007). Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133(+) cells or CD45(+) hematopoietic precursors. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **27**, 1572–1579.
- Tong J, Hoffman R, Siena S, Srour EF, Bregni M & Gianni AM (1994). Characterization and quantitation of primitive hematopoietic progenitor cells present in peripheral blood autografts. *Experimental hematology* **22**, 1016–1024.
- Trevan JW (1918). The Viscosity of Blood. *The Biochemical journal* **12**, 60–71.
- Troconis F, Lubo Palma A, Montiel M, Quevedo AL, Rojas L, Chacin B & Petti M (2008). Valoración postural y riesgo de lesión músculo esquelética en trabajadores de una plataforma de perforación petrolera lacustre. *Salud de los Trabajadores* **16**, 29–38.
- Tytherleigh L, Taparia M & Leahy MF (2001). Detection of hairy cell leukaemia in blood and bone marrow using multidimensional flow cytometry with CD45-PECy5 and SS gating. *Clinical and laboratory haematology* **23**, 385–390.
- Udomsakdi C, Eaves CJ, Sutherland HJ & Lansdorp PM (1991). Separation of functionally distinct subpopulations of primitive human hematopoietic cells using rhodamine-123. *Experimental hematology* **19**, 338–342.
- Ueda K, Clark DP, Chen CJ, Roninson IB, Gottesman MM & Pastan I (1987). The human multidrug resistance (mdr1) gene. cDNA cloning and transcription initiation. *The Journal of biological chemistry* **262**, 505–508.
- Umnova MM & Seene TP (1991). The Effect of Increased Functional Load on the Activation of Satellite Cells in the Skeletal-Muscle of Adult-Rats. *International Journal of Sports Medicine* **12**, 501–504.
- Urbich C & Dimmeler S (2004). Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circulation research* **95**, 343–353.

- Vallée M, Côté J-F & Fradette J (2009). Adipose-tissue engineering: taking advantage of the properties of human adipose-derived stem/stromal cells. *Pathologie-biologie* **57**, 309–317.
- Van't Hof W, Mal N, Raber A, Zhang M, Ting A, S. Penn M & Deans R (2007). *Stem Cells And Myocardial Regeneration*. Penn MS. Humana Press, Totowa, NJ.
- Vanacker J, Viswanath A, De Berdt P, Everard A, Cani PD, Bouzin C, Feron O, Diogenes A, Leprince JG & des Rieux A (2014). Hypoxia modulates the differentiation potential of stem cells of the apical papilla. *Journal of endodontics* **40**, 1410–1418.
- Vater C, Kasten P & Stiehler M (2011). Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta biomaterialia* **7**, 463–477.
- Verfaillie C (2004). Multipotent Adult Progenitor Cells: An Update. *President's Council on Bioethics: Monitoring Stem Cell Research: Appendix J*.
- Verfaillie CM, Pera MF & Lansdorp PM (2002). Stem cells: hype and reality. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program* 369–391.
- Vilastic Scientific (2010). *Applications and Technical Notes: Plasma viscosity and Blood Viscoelasticity*. Austin, TX.
- Viscor G, Javierre C, Pages T, Ventura J-L, Ricart A, Martin-Henao G, Azqueta C & Segura R (2009). Combined intermittent hypoxia and surface muscle electrostimulation as a method to increase peripheral blood progenitor cell concentration. *Journal of Translational Medicine* **7**, 91.
- Viscor G, Torrella JR, Fouces V & Pages T (2003). Hemorheology and oxygen transport in vertebrates. A role in thermoregulation? *Journal of physiology and biochemistry* **59**, 277–286.
- Volkov N., Kovalenko EA, Smirnov VV, Toporyshev CV & Tsytkov V (1992). Metabolic and energetic effects of common applications of interval training and hypoxic hypoxia. In *Interval Hypoxic Training, Efficiency, Mechanisms of Action*, pp. 4–5. ELTA, Kiev.
- Voltarelli JC, Couri CEB, Stracieri ABPL, Oliveira MC, Moraes DA, Pieroni F, Coutinho M, Malmegrim KCR, Foss-Freitas MC, Simões BP, Foss MC, Squiers E & Burt RK (2007). Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA* **297**, 1568–1576.
- Wagatsuma A (2007a). Endogenous expression of angiogenesis-related factors in response to muscle injury. *Molecular and cellular biochemistry* **298**, 151–159.
- Wagatsuma A (2007b). Endogenous expression of angiogenesis-related factors in response to muscle injury. *Molecular and cellular biochemistry* **298**, 151–159.

- Wahl P, Brixius K & Bloch W (2008). Exercise-induced stem cell activation and its implication for cardiovascular and skeletal muscle regeneration. *Minimally invasive therapy & allied technologies : MITAT : official journal of the Society for Minimally Invasive Therapy* **17**, 91–99.
- Wei G, Schubiger G, Harder F & Müller AM (2000). Stem cell plasticity in mammals and transdetermination in *Drosophila*: common themes? *Stem cells (Dayton, Ohio)* **18**, 409–414.
- Weissman IL, Anderson DJ & Gage F (2001). Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annual review of cell and developmental biology* **17**, 387–403.
- Wen J, Tao W, Kuitatse I, Lin P, Feng Y, Jones RJ, Orłowski RZ & Zu Y (2014). Dynamic balance of multiple myeloma clonogenic side population cell percentages controlled by environmental conditions. *International journal of cancer Journal international du cancer*; DOI: 10.1002/ijc.29078.
- Wenger RH (2000). Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *The Journal of experimental biology* **203**, 1253–1263.
- Wenger RH (2006). Mitochondria: oxygen sinks rather than sensors? *Medical hypotheses* **66**, 380–383.
- West JB (1998). *High life: A history of high-altitude physiology and medicine.*, 6ta edn. Published for the American Physiological Society by Oxford University Press, New York.
- West, J.B., R.B. Schoene and JSM (2007). *High Altitude Medicine and Physiology*, 4th editio. Arnold publishers, London: Hodder.
- Wobus AM (2008). *Stem Cells*. Springer.
- Wojciechowski JC, Narasipura SD, Charles N, Mickelsen D, Rana K, Blair ML & King MR (2008). Capture and enrichment of CD34-positive haematopoietic stem and progenitor cells from blood circulation using P-selectin in an implantable device. *British journal of haematology* **140**, 673–681.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ & Black IB (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of neuroscience research* **61**, 364–370.
- Xi L & Serebrovskaya T V (2009). *Intermittent Hypoxia: From Molecular Mechanisms To Clinical Applications*. Xi L, Serebrovskaya T V, Cisneros A & L. Goins B. Nova Science Publishers, New York.
- Xing G et al. (2008). Adaptation and mal-adaptation to ambient hypoxia; Andean, Ethiopian and Himalayan patterns. *PloS one* **3**, e2342.

- Yelmen N, Ozdemir S, Guner I, Toplan S, Sahin G, Yaman OM & Sipahi S (2011). The effects of chronic long-term intermittent hypobaric hypoxia on blood rheology parameters. *General physiology and biophysics* **30**, 389–395.
- Yeung HM, Kravtsov GM, Ng KM, Wong TM & Fung ML (2007). Chronic intermittent hypoxia alters Ca²⁺ handling in rat cardiomyocytes by augmented Na⁺/Ca²⁺ exchange and ryanodine receptor activities in ischemia-reperfusion. *American journal of physiology Cell physiology* **292**, C2046–C2056.
- Zammit PS, Partridge TA & Yablonka-Reuveni Z (2006). The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **54**, 1177–1191.
- Zárate JR (Subdirector de DM (2014). La explosión científica de los estudios de células madre. *Diario Medico*.
- Zhao J, Tian Y, Cao J, Jin L & Ji L (2013). Mechanism of endurance training-induced erythrocyte deformability in rats involves erythropoiesis. *Clinical hemorheology and microcirculation* **53**, 257–266.
- Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H & Sorrentino BP (2001). The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nature medicine* **7**, 1028–1034.
- Zhu L-L, Wu L-Y, Yew DT & Fan M (2005a). Effects of hypoxia on the proliferation and differentiation of NSCs. *Molecular neurobiology* **31**, 231–242.
- Zhu LL, Zhao T, Li HS, Zhao HQ, Wu LY, Ding AS, Fan WH & Fan M (2005b). Neurogenesis in the adult rat brain after intermittent hypoxia. *Brain research* **1055**, 1–6.
- Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X & Cui Z (2008). Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell biochemistry and function* **26**, 664–675.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P & Hedrick MH (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell* **13**, 4279–4295.
- Zúñiga J, Tur Marí J, Milocco S & Piñeiro R (2001). *Ciencia y Tecnología en Protección y Experimentación Animal*. Interamericana. Mc Graw-Hi, Madrid.

7. PUBLICACIONES

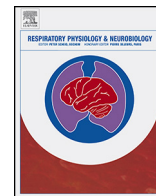
PUBLICACIÓN I

“Effect of intermittent hypoxia and exercise on blood rheology and oxygen transport in trained rats”



Contents lists available at ScienceDirect

Respiratory Physiology & Neurobiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/resphysiol

Effect of intermittent hypoxia and exercise on blood rheology and oxygen transport in trained rats



Cristian Núñez-Espinosa, Anne Douziech, Juan Gabriel Ríos-Kristjánsson, David Rizo, Joan Ramon Torrella, Teresa Pagès, Ginés Viscor*

Departament de Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Edifici Ramon Margalef, Av. Diagonal, 643, E-08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 19 December 2013

Keywords:

Intermittent hypobaric hypoxia
Exercise training
Hemorheology
Blood viscoelasticity
Oxygen transport

ABSTRACT

Intermittent hypobaric hypoxia (IHH) exposure, accompanied or not with active recovery, can help to skeletal muscle repair. However, the erythropoietic response elicited can disturb blood rheology and thus alter the oxygen delivery to tissues. Male Sprague–Dawley rats were studied in two basal states: untrained and trained and compared with early (1–3 days) and late (7–14 days) stages of damage recovery in three groups of trained rats that had suffered skeletal muscle injury: Control, passive recovery rats; HYP, rats exposed to IHH after muscle damage; and EHYP, trained rats that performed light aerobic exercise sessions in addition to IHH. Hematocrit, RBC count and hemoglobin were only elevated in the late stage of recovery in HYP (13%; 14% and 8%) and EHYP (18%; 13% and 15%) groups. Blood viscosity increased about double for EHYP rats. It is concluded that intermittent exposure to hypobaric hypoxia in combination with light aerobic exercise in normoxia has an erythropoietic effect, but also provides advantageous hemorheological conditions for the perfusion of damaged muscle.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Exposure to hypobaric hypoxia is recognized as an important factor that can elicit multiple changes at metabolic and physiological level, most of which are mediated by a signaling pathway dependent on hypoxia-inducible factors (HIFs) (Semenza et al., 2006). Many of these changes protect the body against hypoxia damage by favoring acclimation to altitude (Casas et al., 2000) and improving tissue oxygen availability (Leon-Velarde et al., 2000). It is well established that an advantageous way to obtain these favorable changes is intermittent exposure to hypobaric hypoxia (IHH). This kind of hypoxia stimulus has been widely used in sports and mountain medicine, but recently other potential benefits have been reported including an increase in circulating stem cells (Viscor et al., 2009; Zhu et al., 2005) and muscle tissue adaptations that favor physical training at altitude (Faiss et al., 2013; Hoppeler and Vogt, 2001). However, it is very important to take into account that many treatments involving repeated IHH exposure, and obviously chronic intermittent hypoxia, may have adverse effects on some rheological parameters, such as blood and plasma viscosity (Yelmen et al., 2011), which directly can affect the oxygen delivery

to tissues. Some previous studies were performed in our laboratory to monitor possible hemorheological changes induced by environmental factors (Viscor et al., 2003; Esteve et al., 2009). However, to fully recognize the physiological meaning of hemorheological changes under IHH, measurements of whole blood viscoelasticity must describe the kinetics of blood flow more realistically. Measurements should include viscosity, elasticity and relaxation time under oscillatory flow (Thurston, 1989, 1990; Thurston et al., 2004). Viscoelasticity is an excellent indicator to determine the aggregation and deformability of red blood cells, as the rheological behavior of blood can be studied in the condition imposed for pulsatile circulation (Thurston, 1972, 1979).

Our hypothesis is based on the possible benefits of IHH exposure. We postulated that this type of exposure, combined or not with light aerobic exercise in normoxia, may be a complementary stimulus for the repair of damaged muscle tissues. However, given that blood flow depends on other factors such as hematocrit (Esteve et al., 2009) or changes in plasma components (Kwaan, 2010), it is very important to determine whether whole blood viscoelasticity during an IHH program could provoke excessive erythropoiesis and subsequent alterations in hemorheological behavior that could negatively affect microcirculation, tissue perfusion and oxygen delivery.

Although this paper is part of a larger study on the effects of hypoxia and exercise as a potential tool for skeletal muscle repair

* Corresponding author. Tel.: +34 934021529; fax: +34 934110358.
E-mail addresses: gviscor@ub.edu, gviscor@gmail.com (G. Viscor).

enhancement, in this report we focus on the possible rheological alterations in circulating blood and its effects on oxygen delivery to tissues.

2. Material and methods

2.1. Animals

This study was conducted in the Department of Physiology and Immunology at the University of Barcelona (UB). We used 64 adult male Sprague Dawley rats, with body mass at sampling time ranging from 350 to 410 g. All rats were maintained at 23 °C average temperature under a light–dark cycle of 12 h/12 h, with food and water *ad libitum*.

The animals were randomly pre-assigned to one of the experimental conditions and to a sampling time. All the analyses were carried out through a double blind system by means of bar-coded sample identification. The experimental conditions were: Untrained Group (UNT), which was not subjected to any intervention or training and formed by rats rejecting to run on the treadmill; Trained Group (TRA), which was trained but had not suffered muscle damage before sampling. Three more groups were formed after muscle damage protocol: Control Group (CTRL), trained rats that suffered muscle damage but had no other intervention (passive recovery); Intermittent Hypoxia Group (HYP), trained rats that were exposed to intermittent hypobaric hypoxia sessions after the muscle damage protocol; and Exercise and Intermittent Hypoxia Group (EHYP), trained rats that were subjected to intermittent hypobaric hypoxia sessions plus a rehabilitation exercise program constituted by light aerobic exercise sessions after the muscle damage procedure.

Animals in the UNT and TRA groups were only sacrificed in the basal status, just one day before muscle damage of their peers (t00). In the rest of the experimental groups, sampling was programmed for days one (t01), three (t03), seven (t07) or fourteen (t14) after muscle damage. All procedures were performed in accordance with the internal protocols of our laboratory, which were authorized by the University of Barcelona's Ethical Committee for Animal Experimentation and ratified, in accordance with current Spanish legislation, by the *Departament de Medi Ambient i Habitatge* (file #1899) of the Catalan Government (Generalitat de Catalunya).

2.2. Exercise training protocol

Animals in the TRA, CTRL, HYP and EHYP experimental groups were trained under normal environmental conditions (sea level barometric pressure and 21 ± 2 °C room temperature) on a treadmill (LE 8710, Panlab, Barcelona, Spain). Actual training sessions were preceded by a ten-day preconditioning period, in which the total time, duration of the exercise and daily sessions (one or two) were gradually increased. The further training period consisted of two daily running sessions during the two subsequent weeks. In each 35-min training session, velocity was gradually increased up to 27 m min^{-1} . All the rats in the above mentioned experimental groups carried out this training protocol before the muscle damage session. In both phases, a recovery period of at least 6 h rest was scheduled between the end of first session and the beginning of the second session on the same day.

2.3. Muscle damage protocol

Skeletal muscle damage was induced by eccentric exercise (Armstrong et al., 1983) by means of downhill running at 30 m min^{-1} and 15° of declination until exhaustion. This protocol began after three days at rest following completion of the training period, and was applied twice on the same day: one session in the

morning and one in the afternoon, with a minimum rest period of 4 h between the end of the first session and the beginning of the second one.

2.4. Intermittent hypobaric hypoxia exposure

Intermittent hypobaric hypoxia sessions were performed in a hypobaric chamber with a volume of about 450 L, which provided ample space for three rat cages. The walls of the chamber were made of polymethylmethacrylate plastic, which is transparent and allows for the permanent observation of animals during the exposure protocol. A relative vacuum was created using a rotational vacuum pump (TRIVAC D5E, Leybold, Köln, Germany) and by regulating the airflow rate at the input with a micrometric valve. Inside pressure was controlled by two differential pressure sensors (ID 2000, Leybold, Köln, Germany) driving a diaphragm pressure regulator (MR16, Leybold, Köln, Germany). The target pressure was 462 Torr (equivalent to 4000 m), which was gradually decreased in about 15 min. Once this pressure had been reached, the chamber pressure was maintained and regulated for 4 h. At the end of the session, pressurization was progressively achieved in 15 min.

Only HYP and EHYP animals were submitted to this procedure on a daily schedule. The total days of hypobaric hypoxia exposure varied according to the sampling schedule. Animals assigned to "t01" were only submitted to one session, whereas "t14" were submitted to two weeks of daily exposure. Animals had *ad libitum* access to food and water kept in air-open reservoirs during the hypoxia sessions inside the hypobaric chamber.

2.5. Rehabilitation exercise program

Rats in the EHYP group were subjected to a rehabilitation exercise program consisting of a daily session of light aerobic exercise. Immediately after the hypobaric hypoxia session, these rats were placed on a treadmill to run in accordance with a program of low impact and concentric exercise. The exercise session lasted 20 min, during which rats ran progressively until 30 cm seg^{-1} , with a gradual increase in inclination from 0° to 5°.

2.6. Blood and plasma sampling

Before blood collection, rats were anesthetized with urethane solution (30 g dL^{-1}) at a dosage of 5 ml kg^{-1} . After laparotomy, a 5 mL blood sample was obtained by puncture of vena cava. The sample was immediately divided into two aliquot fractions. The first portion was separated in a sodium heparin tube for the hemorheological analysis. The second portion was stored in an EDTA tube, and was used for the blood count. Both aliquot samples were processed immediately after collection. Plasma was obtained by centrifugation of the blood and its viscosity was immediately measured.

2.7. Viscoelasticity and rheological parameters

Blood viscoelasticity was measured using a BioProfiler rheometer (Vilastic Scientific, Inc., Austin, TX, USA) with a 1 mm i.d. stainless steel measurement tube at a constant temperature of 37 °C. Measurements were obtained at a frequency of 2 Hz in a range from 0.2 to 100 s^{-1} of shear rate ($\dot{\gamma}$). The viscosity, elasticity and relaxation time were tabulated at shear rates of 2.6 s^{-1} , 12.3 s^{-1} and 45.5 s^{-1} corresponding to the strain of 0.2, 1 and 4 as representative values of physiological circulatory conditions. These three strain states correspond to aggregation effects, transition and deformability effects, respectively (Thurston, 1989, 1990). Due to the well-known Newtonian behavior of plasma, this was only measured at 450 s^{-1} in a cone-plate microviscosimeter (Brookfield Digital Rheometer Model DV-III+, Middleborough, MA, USA)

equipped with a CP40 spindle (0.8°) connected to an external bath at 37.0 °C. The sample volume used for both analyses was 0.5 mL.

2.8. Hematological parameters

The hematological parameters were measured with a semi-automated electronic cell counter (Celtac α , Nihon Kohden Corp., Tokyo, Japan). The following measurements were obtained: red blood cell count (RBC), hemoglobin concentration (Hb), hematocrit (Hc), white blood cell count (WBC), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and platelet count (PLT).

2.9. Blood oxygen transport calculations

To improve the physiological insights of the present study, we calculated two coefficients: the oxygen delivery index, which is based on the relationship between hematocrit and blood viscosity ($ODI = Hc/\eta$) (Koch, 1995), and the blood oxygen potential transport capacity, which relates the hemoglobin oxygen capacity (β) and hemoglobin concentration [Hb] with blood viscosity ($BOPTC = \beta \cdot Hb/\eta$) (Hedrick et al., 1986). The β values were fixed (1.34 mL O₂ · g at 37.0 °C) for all the groups. For both indexes, the measured viscosity at the transitional shear rate of 12.3 s⁻¹ was used for the calculations.

2.10. Statistical analysis

Classical descriptive statistics were calculated for each parameter. Data are expressed as mean values \pm standard deviation. A two-way ANOVA (Holm–Sidak) was used to check the effect of treatment on the different stages of the study. A one-way ANOVA (followed by Dunn or Turkey's posthoc methods according to data conditions) was applied to compare the differences in only one of these factors. Calculations were performed by using SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc., San José, CA, USA).

3. Results

Since no statistically significant differences were found between t01 and t03 or between t07 and t14 for any of the parameters, data for these treatment periods were grouped for the whole analysis. Consequently, the merged data were labeled as EARLY (t01 + t03) and LATE (t07 + t014) stages.

3.1. Hematological parameters

Hematological parameters are shown in Table 1. The RBC count was significantly higher in the EARLY stage of CTRL and HYP than in the basal TRA group. In the LATE stage, the count increased more in HYP and EHYP, with values that were significantly higher than those for both the basal UNT and TRA groups. Furthermore, a significant difference in HYP groups was found between the EARLY and LATE stages ($p < 0.05$).

As a general trend, Hb and Hc levels in early and late stages tended to be higher than the basal values. However, significant differences were only detected between the LATE stage and the basal stage for HYP and EHYP. In addition, significant differences were found for Hc values in the EARLY HYP and LATE CTRL groups, in comparison with the UNT basal group.

The WBC count in the EARLY stage in all groups was significantly lower than in UNT ($p < 0.05$), and tended to increase in the LATE stage.

3.2. Blood rheology parameters

Whole blood viscoelastic parameters and plasma viscosity are shown in Table 2. In the EARLY stage, blood viscosity was higher in all groups than in the basal stage, but the differences were only significant in the TRA group. In the LATE stage, the viscosity of the CTRL and HYP groups tended to be lower than in the EARLY phase, especially in the HYP group ($p < 0.05$) and in both groups in comparison with EHYP ($p < 0.05$) for all measured shear strains at this stage (Fig. 1). In addition, the blood viscosity of the LATE EHYP group was considerably higher than in the EARLY phase ($p < 0.05$) and both basal stages ($p < 0.01$).

Plasma viscosity in the EARLY stage tended to be slightly higher in the CTRL, HYP and EHYP groups than in the UNT group. In the LATE stage, the values continued to rise in all groups, especially in EHYP in which it was significantly higher than in the EARLY stage ($p < 0.05$).

The patterns of blood elasticity were similar to those shown by viscosity. In the EARLY stage, blood elasticity increased in the three experimental groups, but was only significantly higher in HYP and EHYP than in the basal TRA group for all shear strain measurements (Fig. 2). In the LATE stage, CTRL and HYP values tended to return to basal values. Remarkably, EHYP maintained high elasticity with respect to the other groups, especially at shear rates corresponding to the agreeability zone (shear strain = 0.2), with respect to the CTRL ($p < 0.05$) and TRA ($p < 0.05$) groups, and also in the deformability zone (strain = 4) compared to the TRA group ($p < 0.05$). Blood elasticity was only significantly different between TRA and UNT groups in the deformability zone.

The relaxation time (T_r) was only significantly different in the agreeability zone between TRA and UNT groups, but interestingly the TRA group had lower T_r for all the measured range of shear strain. Similarly, LATE EHYP tended to resemble basal TRA values, especially in the deformability zone.

The blood oxygen potential transport capacity and the oxygen delivery index are shown in Fig. 3. The TRA group had the highest values for both indices, which, as expected, were significantly different from the UNT, HYP and EHYP groups in the EARLY stage, and the EHYP in the LATE stage. The trend was similar for both indexes, and the three experimental groups in the EARLY stage had similar values to the UNT group. However, in the LATE stage, the values for CTRL and HYP were higher than in the previous stage, although significant differences were only detected between the two HYP stages ($p < 0.05$). In contrast, EHYP values for the two indices were significantly lower than HYP values ($p < 0.01$). Thus, the trend in EHYP was the opposite of that found in the other groups, and the difference was much more striking in the LATE phase. The decrease was also significant with respect to the two basal stages UNT and TRA ($p < 0.01$). Regarding the effect of the recovery treatment, significant differences were found between HYP and EHYP for both indexes.

4. Discussion

4.1. Hematological parameters

The values for basal (UNT) hematological parameters were similar to those in the literature. The RBC, Hb and Hc of the HYP and EHYP groups were higher than in the basal group, as a result of the erythropoietic response elicited by intermittent exposure to simulated altitude (Esteve et al., 2009). Thus, the combined effect of hypoxia exposure followed by short and light exercise seems evident in comparison to basal UNT. TRA rats showed lower values of Hc and RBC than the UNT group. A more intense training (a 4 weeks program 1 h/day running at 25 m min⁻¹) offered a slight

Table 1
Hematological parameters for the groups and stages.

	S	G	BASAL		EARLY			LATE		
			UNT (n=7)	TRA (n=7)	CTRL (n=10)	HYP (n=10)	EHYP (n=7)	CTRL (n=7)	HYP (n=10)	EHYP (n=6)
WBC ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)			21.45 \pm 4.92	17.40 \pm 3.41	15.58 \pm 3.64 ^d	16.57 \pm 4.53 ^d	14.67 \pm 3.06 ^d	17.83 \pm 4.70	17.59 \pm 3.45	16.77 \pm 3.29
RBC ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$)	2		7.42 \pm 0.68	7.26 \pm 0.79	7.99 \pm 0.38 ^e	7.95 \pm 0.44 ^e	7.93 \pm 0.66	7.96 \pm 0.46	8.48 \pm 0.54 ^{ed}	8.40 \pm 0.42 ^{ed}
Hb (g dL ⁻¹)			14.36 \pm 1.29	14.38 \pm 1.72	15.13 \pm 0.69	15.03 \pm 1.17	15.47 \pm 1.25	15.31 \pm 0.60	15.46 \pm 2.62 ^{ed}	16.53 \pm 0.71 ^{ed}
Hc (%)			41.57 \pm 2.40	41.50 \pm 4.67	43.96 \pm 2.43	45.45 \pm 3.10 ^d	45.17 \pm 3.46	45.14 \pm 2.02 ^d	47.24 \pm 2.10 ^{ed}	49.06 \pm 2.29 ^{ed}
MCV (fL)			56.27 \pm 3.39	57.21 \pm 1.18	55.06 \pm 2.58	57.24 \pm 2.85	57.00 \pm 0.91	56.79 \pm 1.51	55.76 \pm 1.81	57.65 \pm 0.98
MCH (pg)			19.25 \pm 1.56	19.80 \pm 0.67	18.95 \pm 0.78	18.97 \pm 1.66	19.53 \pm 0.38	19.27 \pm 0.71	18.28 \pm 2.71	19.75 \pm 0.32
MCHC (g dL ⁻¹)			34.92 \pm 0.45	34.61 \pm 0.52	34.43 \pm 0.77	33.21 \pm 2.84	34.23 \pm 0.65	33.95 \pm 1.08	32.93 \pm 4.73	34.28 \pm 0.33
PLT ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)			771 \pm 171	696 \pm 118	588 \pm 155	659 \pm 136	671 \pm 178	680 \pm 304	785 \pm 174	816 \pm 245

Hematological parameters for the groups and stages. All data are mean \pm standard deviation. Multiple comparisons were performed by a two-way analysis of variance (2-way ANOVA) taking as factors Group (CTRL; HYP; EHYP) presented in G column and Stage (EARLY, corresponding to t01 and t03 or LATE, corresponding to t07 and t14) presented in S column. We performed one-way ANOVA to compare the experimental groups with BASAL states (UNT or TRA). Significant differences are described according to the following codes: for $p < 0.05$; 2: EARLY vs. LATE within; e: vs. TRA; d: vs. UNT.

Table 2
Viscosity, elasticity and relaxation time for the groups and stages.

	S	G	BASAL		EARLY			LATE		
			UNT (n=7)	TRA (n=7)	CTRL (n=10)	HYP (n=10)	EHYP (n=7)	CTRL (n=7)	HYP (n=10)	EHYP (n=6)
$\eta' \gamma = 0.2$ (cP)	2 3	A B	2.43 \pm 1.53	1.76 \pm 1.91	2.88 \pm 2.06 ^e	3.25 \pm 1.80 ^e	3.14 \pm 1.85 ^e	2.06 \pm 1.39 ^b	1.85 \pm 0.90 ^c	5.63 \pm 0.45 ^{fn}
$\eta'' \gamma = 0.2$ (cP)			3.12 \pm 2.50	1.32 \pm 2.52	4.32 \pm 3.57	5.06 \pm 4.16 ^e	5.69 \pm 5.77 ^e	1.66 \pm 2.47 ^a	2.76 \pm 3.74	4.35 \pm 2.00 ^e
$Tr \gamma = 0.2$ (s)		C	0.108 \pm 0.09	0.037 \pm 0.02	0.138 \pm 0.17	0.163 \pm 0.19	0.233 \pm 0.31	0.126 \pm 0.27	0.114 \pm 0.14	0.064 \pm 0.03
$\eta' \gamma = 1$ (cP)	2 3	A B	2.53 \pm 1.47	1.78 \pm 1.98	3.07 \pm 2.20 ^e	3.11 \pm 1.80 ^e	3.02 \pm 1.56 ^e	2.11 \pm 1.22 ^b	1.66 \pm 0.70 ^c	5.61 \pm 0.75 ^{fn}
$\eta'' \gamma = 1$ (cP)			2.39 \pm 2.16	1.24 \pm 2.41	3.28 \pm 3.00	4.07 \pm 3.56 ^e	4.71 \pm 4.93 ^e	1.43 \pm 2.11	2.26 \pm 3.23	3.52 \pm 1.28
$Tr \gamma = 1$ (s)			0.071 \pm 0.06	0.033 \pm 0.02	0.099 \pm 0.12	0.146 \pm 0.18	0.176 \pm 0.22	0.057 \pm 0.09	0.104 \pm 0.13	0.045 \pm 0.05
$\eta' \gamma = 4$ (cP)	4 5	A B	2.84 \pm 1.76	1.76 \pm 1.97	3.41 \pm 2.41 ^e	3.81 \pm 2.06 ^e	3.62 \pm 1.82	2.44 \pm 1.63 ^c	1.82 \pm 1.00 ^c	6.64 \pm 0.72 ^{fn}
$\eta'' \gamma = 4$ (cP)		C	2.18 \pm 1.74	0.97 \pm 1.78	2.86 \pm 2.52	2.45 \pm 1.71 ^e	3.95 \pm 3.57 ^e	1.48 \pm 1.90	1.79 \pm 2.37	3.83 \pm 0.80 ^e
$Tr \gamma = 4$ (s)			0.056 \pm 0.04	0.029 \pm 0.02	0.072 \pm 0.08	0.055 \pm 0.05	0.110 \pm 0.13	0.048 \pm 0.07	0.074 \pm 0.08	0.045 \pm 0.01
η_p (cP)	3		1.67 \pm 0.43	1.65 \pm 0.25	1.72 \pm 0.26	1.74 \pm 0.31	1.75 \pm 0.48	1.83 \pm 0.40	1.88 \pm 0.67	2.06 \pm 0.59

Viscous component (η'), elastic component (η''), relaxation time (Tr) and plasma viscosity (η_p) for the groups and stages. All data are mean \pm standard deviation. Multiple comparisons were performed by a two-way analysis of variance (2-way ANOVA) taking as factors Group (CTRL; HYP; EHYP) presented in G column and Stage (EARLY, corresponding to t01 and t03 or LATE, corresponding to t07 and t14) presented in S column. We performed one-way ANOVA to compare the experimental groups with BASAL states (UNT or TRA). Significant differences are described according to the following codes: for $p < 0.05$; A: EHYP vs. CTRL; B: EHYP vs. HYP; C: UNT vs. TRA; 2: EARLY vs. LATE within HYP; 3: EARLY vs. LATE within EHYP; a: vs. EHYP late stage; e: vs. TRA; d: vs. UNT. Significant differences for $p < 0.01$ are represented as: 4: EARLY vs. LATE within HYP; 5: EARLY vs. LATE within EHYP; b: vs. LATE EHYP. Significant differences for $p < 0.001$ are represented as: c: vs. LATE EHYP; f: vs. TRA; n: vs. UNT.

reverse trend in Wistar rats (Senturk et al., 2001). However the same trend observed in this study on the hematological parameters was found in a longer and intense training program (Zhao et al., 2013). In this study, we did not find values as high as those reported in a recent study on rats that carried out exhausting exercise sessions with normobaric hypoxia exposure patterns similar to those widely used by human athletes (Bor-Kucukatay et al.,

2013). The EHYP group tended to have slightly higher Hb and Hc than the HYP group, probably as a result of the additional stimulus induced by exercise sessions in normoxia following hypoxia exposure, which can cause a greater transitory oxygen demand, reinforcing the previous hypoxia-induced EPO secretion. Therefore, exposure to hypoxia, which is known to stimulate erythropoiesis in rats (Esteva et al., 2009; Martinez-Bello et al., 2011), followed

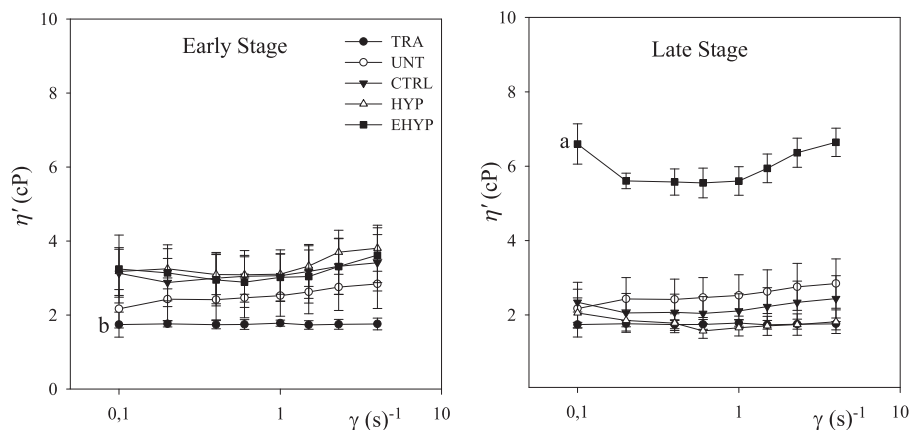


Fig. 1. Whole blood viscosity (η') rheograms for EARLY and LATE stages. Significant differences are indicated according to the following codes: a: LATE EHYP vs. UNT ($p < 0.05$); TRA ($p < 0.001$); LATE CTRL ($p < 0.01$) and LATE HYP ($p < 0.001$); b: TRA vs. EARLY CTRL at $\gamma = 0.1-0.6$ ($p < 0.05$) and $\gamma = 1-4$ ($p < 0.01$); EARLY HYP at $\gamma = 0.1$ ($p < 0.05$) and $\gamma = 0.2-4$ ($p < 0.01$); EARLY EHYP at $\gamma = 0.2-1.5$ ($p < 0.05$) and $\gamma = 2.3-4$ ($p < 0.01$); UNT at $\gamma = 0.2-2.3$ ($p < 0.05$) and $\gamma = 4$ ($p < 0.01$).

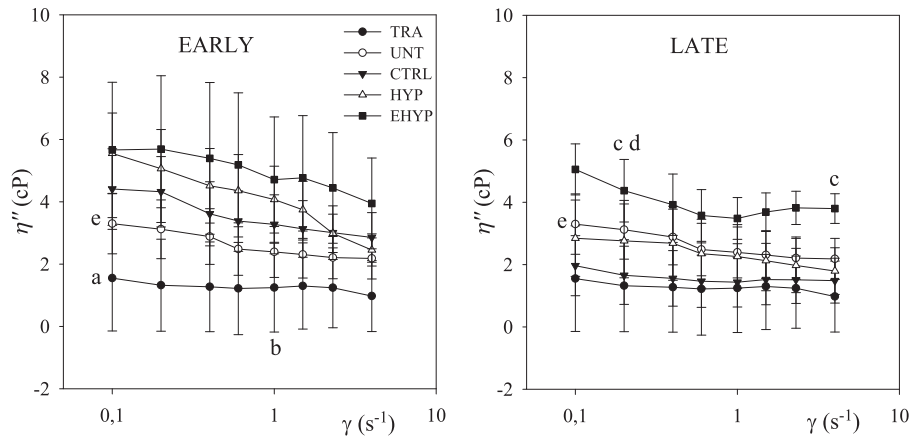


Fig. 2. Whole blood elasticity (η') rheograms for EARLY and LATE stages. Significant differences are indicated according to the following codes: a: TRA vs. EARLY EHYP at $\gamma=0.2-4$ ($p < 0.05$); EARLY HYP ($p < 0.05$); b: TRA vs. EARLY CTRL ($p < 0.05$); c: LATE EHYP vs. TRA ($p < 0.05$); d: LATE CTRL vs. LATE EHYP ($p < 0.05$); e: TRA vs. UNT at $\gamma=1.5-4$ ($p < 0.05$).

by normobaric moderate exercise, can have a synergistic effect increasing the erythropoietic response due to the hypoxia exposure.

4.2. Blood rheological behavior

In the basal stage, there were no significant changes in viscosity and elasticity after the training program, as has been reported after prolonged endurance training (Connes et al., 2012; Zhao et al., 2013). However, viscosity and elasticity were lower in the TRA group. In addition, the Tr of the TRA group was consistently lower, especially in the area of aggregability. Thus, we can infer that two weeks of training cause a higher RBC turnover that would improve future hemorheological changes.

After the muscle damage protocol, the whole blood viscoelasticity completely changed. The CTRL, HYP and EHYP groups in the EARLY stage showed significantly higher blood viscosity at any shear strain, than TRA group ($p < 0.05$), probably as a consequence of the low values found in TRA group. However, in the LATE stage, the total blood viscoelasticity tended to decrease. It approached UNT values in viscosity and TRA values in elasticity, especially in the deformability area. This result indicates a gradual normalization of these parameters.

The two experimental groups exposed to hypoxia visibly differed from the CTRL group. In the LATE stage, HYP showed lower values, as opposite to the EARLY phase, whereas in the LATE stage

EHYP present greater values of blood viscosity and elasticity. This decrease of HYP in whole blood viscosity at the LATE phase led to values similar to those of the TRA group, but with greater elasticity and Tr. The rheological adjustments may favor compensatory alteration, in terms of microcirculation, in response to the increase in RBC count, Hb and Hc.

The rheological behavior found in the EHYP group is very different from that in the above mentioned groups. Viscosity in the EARLY stage was very similar to HYP, but elasticity and Tr were higher. This could indicate better RBC membrane deformability, contrary to that observed in other studies where rats were subjected to different protocols of exercise and hypoxia exposure (Bor-Kucukatay et al., 2013). However, the values changed greatly in the LATE phase, blood viscosity was increased, rising similar values to those described after chronic hypoxia exposure (Pichon et al., 2012) or intermittent chronic hypoxia (Yelmen et al., 2011), but with a tendency to increase of RBC deformability, as can be deduced of the lower Tr. Blood viscosity was also significantly different into the whole range of measured shear strain for EHYP as compared to the other groups in the LATE stage, similarly to the observations reported in human and rats after exercise training (Connes et al., 2012; Zhao et al., 2013). This can be explained by the slightly increased plasma viscosity and the higher registered Hc and MCV, while the highest level of Hb was maintained. This can indicate that there was a higher number of young circulating RBC (Clark, 1988). A remarkable increase in blood elasticity was found, with significant

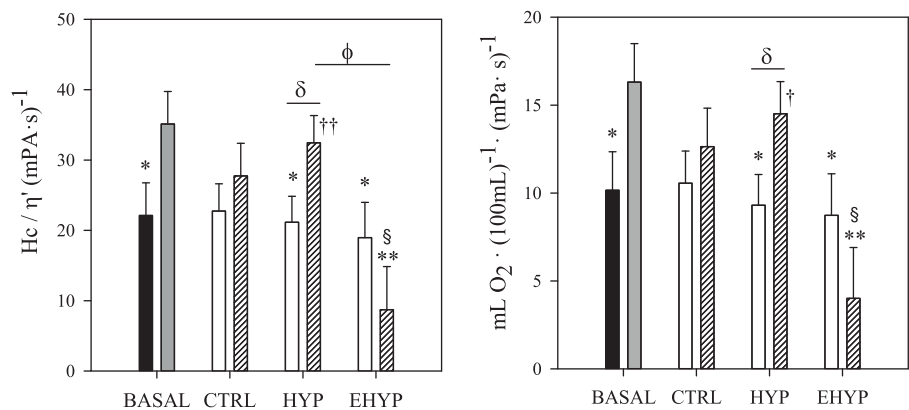


Fig. 3. Oxygen delivery index and blood oxygen potential transport capacity histograms for the experimental groups and stages. The UNT group (black bar) and the TRA group (gray bar) are represented as BASAL stage. Values were calculated for the observed values of blood viscosity at $\gamma=1$. Significant differences are indicated according to the following code: *: vs. TRA ($p < 0.05$); **: vs. TRA ($p < 0.01$); §: vs. UNT ($p < 0.01$); †: LATE HYP vs. LATE EHYP ($p < 0.05$); ††: LATE HYP vs. LATE EHYP ($p < 0.01$); φ: HYP vs. EHYP ($p < 0.05$); δ: EARLY vs. LATE within HYP ($p < 0.05$).

differences in the deformability shear zone, and similar Tr values to those found in the basal TRA group.

4.3. Oxygen transport estimates

As expected, the two studied indexes, blood oxygen potential transport index and the oxygen delivery index, were considerably higher in the TRA group. Only 1–3 days after muscle damage, a drastic decrease in both indexes was observed, reaching values that approached those of the UNT subjects, especially in the groups subjected to hypoxia. A similar reduction was observed in a previous study on the acetazolamide effects on chronic hypoxia exposure in rats (Pichon et al., 2012). However, in the LATE stage, the values in the CTRL and HYP groups increased again, especially in the HYP group, whose values tended to approach those of TRA group. This effect is mainly due to a decrease in total blood viscosity, which we know is caused by a decrease in simultaneous plasma viscosity and fibrinogen values as a compensatory response to reduced whole blood viscosity under hypoxia exposure (Esteve et al., 2009). An opposite effect was observed in the EHYP group in the LATE stage, due to a marked reduction of both indexes mainly as a result of the higher whole blood and also, at a lesser extent, of plasma viscosity at this stage. Despite a negative potential effect of these oxygen delivery indicators for EHYP group, the increased elasticity and relaxation time can provide a compensatory mechanism thus reducing the unfavorable impact of an increased viscosity for tissue perfusion.

An important limitation to this study is the scope and the methodologies applied, which made it impossible to determine the possible influence of fibrinogen or other plasma components on plasma viscosity. In future studies, these factors could be considered to correlate the underlying mechanisms of the increased plasma viscosity with greater accuracy.

5. Conclusion

Intermittent exposure to hypobaric hypoxia (simulated altitude) combined with light aerobic exercise in normoxia, after two weeks of treatment, altered hemorheological parameters in comparison to the other experimental conditions. Although the erythropoietic response elicited by intermittent hypobaric hypoxia exposure tends to increase the viscosity of blood, other rheological parameters such as higher blood elasticity and shorter relaxation time may contribute to compensate for this augmentation. Such compensatory changes can contribute to maintain the adequate delivery of oxygen, nutrients and chemical agents to tissue during their repair process after skeletal muscle damage.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest to disclose.

Acknowledgments

This study was supported by DEP2010-22205-C02-01 grant from the Plan Nacional I+D+i 2008-2011 (Spain's Ministry of Economy and Competitiveness).

References

- Armstrong, R.B., Ogilvie, R.W., Schwane, J.A., 1983. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal-muscle. *J. Appl. Physiol.* 54, 80–93.
- Bor-Kucukatay, M., Colak, R., Erken, G., Kilic-Toprak, E., Kucukatay, V., 2013. Altitude training induced alterations in erythrocyte rheological properties: a controlled comparison study in rats. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* (Epub ahead of print).
- Casas, M., Casas, H., Pages, T., Rama, R., Ricart, A., Ventura, J.L., Ibanez, J., Rodriguez, F.A., Viscor, G., 2000. Intermittent hypobaric hypoxia induces altitude acclimation and improves the lactate threshold. *Aviat. Space Environ. Med.* 71, 125–130.
- Clark, M.R., 1988. Senescence of red blood-cells – progress and problems. *Physiol. Rev.* 68, 503–554.
- Connes, P., Pichon, A., Hardy-Dessources, M., Waltz, X., Lamarre, Y., Simmonds, M.J., Tripette, J., 2012. Blood viscosity and hemodynamics during exercise. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 51, 101–109.
- Esteve, S., Panisello, P., Ramon Torrella, J., Pages, 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.
- Faiss, R., Leger, B., Vesin, J., Fournier, P., Eggel, Y., Deriaz, O., Millet, G.P., 2013. Significant molecular and systemic adaptations after repeated sprint training in hypoxia. *PLoS One* 8, e56522.
- Hedrick, M.S., Duffield, D.A., Cornell, L.H., 1986. Blood-viscosity and optimal hematocrit in a deep-diving mammal, the northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*). *Can. J. Zool.* 64, 2081–2085.
- Hoppeler, H., Vogt, M., 2001. Muscle tissue adaptations to hypoxia. *J. Exp. Biol.* 204, 3133–3139.
- Koch, H.J., 1995. Possible role of erythrocyte sedimentation-rate, hematocrit and oxygen-supply of tissue in clinical investigations. *Cardiology* 86, 177–178.
- Kwaan, H.C., 2010. Role of plasma proteins in whole blood viscosity: a brief clinical review. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 44, 167–176.
- Leon-Velarde, F., Gamboa, A., Chuquiza, J.A., Esteba, W.A., Rivera-Chira, M., Monge, C.C., 2000. Hematological parameters in high altitude residents living at 4,355, 4,660, and 5,500 meters above sea level. *High Alt. Med. Biol.* 1, 97–104.
- Martinez-Bello, V.E., Sanchis-Gomar, F., Lucia Nascimento, A., Pallardo, F.V., Ibanez-Sania, S., Olaso-Gonzalez, G., Antonio Calbet, J., Carmen Gomez-Cabrera, M., Vina, J., 2011. Living at high altitude in combination with sea-level sprint training increases hematological parameters but does not improve performance in rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* 111, 1147–1156.
- Pichon, A., Connes, P., Quidu, P., Merchant, D., Brunet, J., Levy, B.I., Vilar, J., Safeukui, I., Cymbalista, F., Maignan, M., Richalet, J., Favret, F., 2012. Acetazolamide and chronic hypoxia: effects on haemorheology and pulmonary haemodynamics. *Eur. Respir. J.* 40, 1401–1409.
- Semenza, G.L., Shimoda, L.A., Prabhakar, N.R., 2006. Regulation of gene expression by HIF-1. *Novartis Found. Symp.* 272, 2–8 (discussion 8–14, 33–36).
- Senturk, U.K., Gunduz, F., Kuru, O., Aktekin, M.R., Kipmen, D., Yalcin, O., Bor-Kucukatay, M., Yesilkaya, A., Baskurt, O.K., 2001. Exercise-induced oxidative stress affects erythrocytes in sedentary rats but not exercise-trained rats. *J. Appl. Physiol.* 91, 1999–2004.
- Thurston, G.B., 1990. Light transmission through blood in oscillatory flow. *Biorheology* 27, 685–700.
- Thurston, G.B., 1989. Plasma release-cell layering theory for blood-flow. *Biorheology* 26, 199–214.
- Thurston, G.B., 1979. Rheological parameters for the viscosity viscoelasticity and thixotropy of blood. *Biorheology* 16, 149–162.
- Thurston, G.B., 1972. Viscoelasticity of human blood. *Biophys. J.* 12, 1205.
- Thurston, G.B., Henderson, N.M., Jeng, M., 2004. Effects of erythrocytapheresis transfusion on the viscoelasticity of sickle cell blood. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 30, 83–97.
- Viscor, G., Torrella, J.R., Fouces, V., Pages, T., 2003. Hemorheology and oxygen transport in vertebrates. A role in thermoregulation? *J. Physiol. Biochem.* 59, 277–286.
- Viscor, G., Javierre, C., Pages, T., Ventura, J., Ricart, A., Martin-Henao, G., Azqueta, C., Segura, R., 2009. Combined intermittent hypoxia and surface muscle electrostimulation as a method to increase peripheral blood progenitor cell concentration. *J. Transl. Med.* 7, 91.
- Yelmen, N., Ozdemir, S., Guner, I., Toplan, S., Sahin, G., Yaman, O.M., Sipahi, S., 2011. The effects of chronic long-term intermittent hypobaric hypoxia on blood rheology parameters. *Gen. Physiol. Biophys.* 30, 389–395.
- Zhao, J., Tian, Y., Cao, J., Jin, L., Ji, L., 2013. Mechanism of endurance training-induced erythrocyte deformability in rats involves erythropoiesis. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 53, 257–266.
- Zhu, L.L., Zhao, T., Li, H.S., Zhao, H.Q., Wu, L.Y., Ding, A.S., Fan, W.H., Fan, M., 2005. Neurogenesis in the adult rat brain after intermittent hypoxia. *Brain Res.* 1055, 1–6.

PUBLICACIÓN II

“Effects of Intermittent Hypoxia and Light Aerobic
Exercise on Circulating Stem Cells and Side Population,
After Strenuous Eccentric Exercise in Trained Rats”

Effects of Intermittent Hypoxia and Light Aerobic Exercise on Circulating Stem Cells and Side Population, After Strenuous Eccentric Exercise in Trained Rats

Cristian Núñez-Espinosa¹, Inês Ferreira¹, Juan Gabriel Ríos-Kristjánsson¹, David Rizo-Roca¹, Maria Dolors García Godoy², Laura G. Rico², Gerard Rubi-Sans², Joan Ramon Torrella¹, Teresa Pagès¹, Jordi Petriz² and Ginés Viscor^{1,*}

¹Departament de Fisiologia i Immunologia, Universitat de Barcelona, Spain; ²Vall d'Hebron Institut de Recerca, Barcelona, Spain

Abstract: Our goal was to address if intermittent hypobaric hypoxia (IHH) exposure can help to increase the number of peripheral blood circulating progenitor cells and side population (SP) stem cells, in order to establish the usefulness of this intervention for skeletal muscle repair, because these cells play a role in tissue regeneration. Male Sprague-Dawley rats were studied in two basal states: untrained and trained and compared with 1, 3, 7 and 14 days stages of damage recovery of trained rats that had suffered skeletal muscle injury. Three experimental groups were studied: rats with passive recovery (CTRL); rats exposed to IHH after muscle damage (HYP); and, trained rats that, in addition to IHH, performed light aerobic exercise sessions (EHYP). We observed an increase in hematopoietic stem cells (HSCs) (mean = 0.153% of cells) and endothelial progenitor cells (EPCs) (mean = 0.0020 % of cells) in EHYP on day 7. Also these cells showed characteristics of more primitive progenitors in comparison to the other experimental groups (mean = 0.107 % of cells), as deduced by retention of the promising fluorescent probe Vybrant Dye Cycle Violet. We concluded that intermittent exposure to hypobaric hypoxia in combination with light aerobic exercise increased the number of HSCs and EPCs on the 7th day in EHYP group, although the exercise-induced stimulus showed a reverse effect on SP kinetics.

Keywords: Eccentric exercise, intermittent hypobaric hypoxia, side population cells, stem cells.

1. INTRODUCTION

Hypoxia is a significant environmental variable that is used in sports as added training stimulus to improve physical performance. While prolonged exposure to a hypoxic environment induces physical harm [1, 2]; acute exposure to hypobaric hypoxia is recognized as an important generator of multiple adaptive alterations at metabolic and physiological levels [3-5]. Intermittent exposure to hypobaric hypoxia (IHH) has been used as an efficient method for the improvement of aerobic capacity and high altitude acclimatization by eliciting erythropoiesis [6, 7]. It has also produced favorable adaptive responses in skeletal muscle [8]. In addition, recent reports have demonstrated an association between exposure to intermittent hypoxia and an increase in circulating hematopoietic stem cells [9].

Stem cells (SCs) can self-renew and differentiate into other cell lineages, having a key role in vascular disorders and tissue regeneration [10]. Hematopoietic stem cells (HSCs), present in blood and bone marrow, form mature blood cells, such as erythrocytes, platelets and leukocytes. In humans, HSCs are used to reconstitute the hematopoietic

system for the treatment of many malignant and non-malignant diseases.

It is well established that HSCs increase in response to different stimuli such as intermittent hypoxia [11]. Moreover, exercise is an important stimulus of HSCs increase, as well as for endothelial progenitor cells (EPCs) recruitment. These EPCs, play an important role in contributing to vascular regeneration and angiogenesis induced by the exercise stimulus [12, 13]. Exercise also plays a key role in the treatment and regeneration of training-induced muscle damage [14]. The mechanisms for these actions are not wholly understood; but, it has been established that exercise stimulates HSCs mobilization for muscle regeneration [15], recruits peripheral blood circulating HSCs [16] and increases circulating EPCs, which is critical in the early phase of muscle regeneration [17].

A fraction of the bone marrow stem cell population, known as side population cells (SP), has become an important hallmark for the defining of the stem cell compartment. Competitive repopulation experiments demonstrated that these cells contain the vast majority of HSC activity from murine bone marrow and need to be enriched at least 1,000-fold before *in vivo* reconstitution occurs [18]. Zhou *et al.* identified in the SP the Bcrp1/ABCG2 transporter pump, a member of the ATP binding cassette (ABC) transporter superfamily responsible for dye efflux and drug resistant char-

*Address correspondence to this author at the Departament de Fisiologia i Immunologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 643; E-08028 Barcelona, Spain; Tel: +34 934021529; Fax: +34 934110358; E-mail: gviscor@ub.edu

acteristics [19]. In addition to bone marrow, these cells are present in a wide variety of tissues and may have important therapeutic value for tissue regeneration [20-23].

The goal of this study was to investigate whether intermittent hypobaric hypoxia, in combination with or without light aerobic exercise sessions, can function as a possible tool for improvement of skeletal muscle damage recovery by increasing the number of peripheral blood circulating progenitors and side population stem cells in rats injured by exhaustive eccentric contraction exercise.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Animals

This study was jointly conducted by the Department of Physiology and Immunology at the University of Barcelona (UB) and the Vall d'Hebron Research Institute (VHIR) in Barcelona. Adult male Sprague Dawley rats ($n=52$), with a body mass at sampling time ranging from 350 to 410 g, were used. All rats were maintained at 23°C average temperature under a light-dark cycle of 12h /12h, with food and water *ad libitum*.

The animals were randomly pre-assigned to one of the experimental conditions and to a sampling time. All the analyses were carried out through a double blind system using means of bar-coded sample identification. The experimental basal conditions consisted of Untrained Rats (UNT), which were not subjected to any intervention or training; the Control Group (CTRL) of trained rats, which suffered an strenuous eccentric exercise protocol for muscle damage but no other intervention (passive recovery); the Intermittent Hypoxia Group (HYP) of trained rats, which were exposed to intermittent hypobaric hypoxia sessions after the muscle damage protocol; and the Exercise and Intermittent Hypoxia Group (EHYP) of trained, rats which were subjected to intermittent hypobaric hypoxia sessions plus a rehabilitation exercise program consisting of a light aerobic exercise sessions after the above mentioned muscle damage procedure. Animals in the UNT group were only killed at basal status, just one day before muscle damage of their peers (day 0). Sampling was programmed for days one (day 1), three (day 3), seven (day 7) or fourteen (day 14) after muscle damage, for the remaining experimental groups. Each subgroup consisted of $n=4$ rats, and all procedures were performed in accordance with the internal protocols and quality assurance system of our laboratory. The present study was authorized by the University of Barcelona's Ethical Committee for Animal Experimentation, in accordance with current Spanish legislation, and by the Department of Environment and Housing (file #1899) of the Autonomous Government of Catalonia (*Generalitat de Catalunya*).

2.2. Exercise Training Protocol

Animals from CTRL, HYP and EHYP experimental groups were trained under normal environmental conditions (sea level barometric pressure and $21 \pm 2^\circ\text{C}$) on a treadmill (LE 8710, Panlab, Barcelona, Spain). Training sessions were preceded by a ten-day preconditioning period, in which duration of the exercise and daily sessions (one or two) were gradually increased. The further training period consisted of

two daily running sessions for two weeks. Speed was gradually increased up to $45 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ for each 35-minute training session. A recovery period of at least 6 h rest was scheduled between the end of the first session and the beginning of the second session on the same day. Prior to the strenuous eccentric exercise (muscle damage) procedure, all rats in the three experimental groups were involved in this training protocol.

2.3. Strenuous Eccentric Exercise Protocol

Skeletal muscle damage was induced by strenuous eccentric muscle contraction exercise [24], consisting of downhill running at $50 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ and 15° of negative surface inclination until exhaustion. This protocol began after three days at rest after completion of the training period, and was applied twice on the same day: one session in the morning and one in the afternoon, with a minimum rest period of 4 h between the end of the first session and the beginning of the second one.

2.4. Intermittent Hypobaric Hypoxia Exposure

Intermittent hypobaric hypoxia sessions were performed using a hypobaric chamber with a volume of about 450 L, providing space for three rat cages. The walls of the chamber were made of polymethylmethacrylate plastic, which is transparent and allows for the permanent observation of animals during exposure to simulated altitude. A relative vacuum was created by a rotational vacuum pump (TRIVAC D5E, Leybold, Köln, Germany) with its regulating the air-flow rate regulated at the input by a micrometric valve. Inner pressure was controlled by two differential sensors (ID 2000, Leybold, Köln, Germany) driving a diaphragm pressure regulator (MR16, Leybold, Köln, Germany). The target pressure was 462 torr (equivalent to 4,000 meters of altitude), which was decreased steadily over about 15 minutes. Once this pressure had been reached, the chamber pressure was maintained and regulated for 4 hours. At the end of the session, pressurization to normal barometric pressure was gradually restored over 15 minutes.

Only HYP and EHYP animals were enrolled in the program for intermittent hypobaric hypoxia on a daily schedule. The total days of hypobaric hypoxia exposure varied according to the sampling schedule. Animals assigned to "day 1" were in the hypobaric chamber for a single session, whereas "day 14" animals were enrolled for two weeks of daily exposure. Animals had *ad libitum* access to food and water kept in air-open reservoirs during the hypoxia sessions inside the hypobaric chamber.

2.5. Rehabilitation Exercise Program

EHYP rats were enrolled in the rehabilitation exercise program, consisting of a daily session of light aerobic exercise. Immediately after the hypobaric hypoxia session, these rats were placed on a treadmill to run in accordance with a program of low impact and concentric exercise. The exercise session lasted 20 minutes, during which rats ran progressively up to $30 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$, with a gradually increased of surface inclination from 0° to 5° .

2.6. Blood Samples

Prior to blood collection, rats were anesthetized with urethane solution ($30 \text{ g}\cdot\text{dL}^{-1}$) at a dosage of $5 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$. Blood

samples were taken after laparotomy and puncture of vena cava, anticoagulated with EDTA and immediately prepared for flow cytometry.

2.7. Flow Cytometric Immunophenotyping

Anticoagulated blood containing 5×10^5 cells ($\approx 50 \mu\text{L}$), was incubated in the presence of PE-CD34 and FITC-CD45 antibodies, as recommended by the manufacturer. Vybrant DyeCycle Violet stain (DCV) was added after 15 min of incubation at a final concentration of $10 \mu\text{M}$. Cell incubation was stopped after 5 min, and blood cells were diluted using Attune 1X focusing fluid (1/8 v/v), prior to sample acquisition.

2.8. Hematological Parameters

Hematological parameters were measured with a semi-automated electronic cell counter (Celtac α , Nihon Kohden Corp., Tokyo, Japan). The following measurements were taken: red blood cell counts (RBC), hemoglobin concentration (Hb), hematocrit (Hc), white blood cell counts (WBC), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and platelet counts (PLT).

2.9. Side Population Analysis

The side population assay was performed as previously described [25]. Bone marrow cells were obtained by flushing the femur of rats with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS). Bone marrow yield was determined under the microscope by using a hemocytometer. The original Hoechst staining protocol describes the use of this dye to identify and purify murine hematopoietic stem cells. Alternatively, when cells are loaded with DCV and analyzed on a violet laser diode-equipped flow cytometer, a side population similar to the traditional Ho342 SP is observed (Fig. 5). DCV was added at a concentration of $10 \mu\text{M}$ and incubated for 90 min in a water bath at 37°C with periodic agitation. Cells were then centrifuged for 6 min at $483 \times g$, 4°C , and re-suspended at a concentration of $1\text{--}2 \cdot 10^7$ cells $\cdot\text{ml}^{-1}$ in cold HBSS containing 2% FBS and 10 mM HEPES. Samples were kept at 4°C until analysis. Propidium iodide (PI) was added at a concentration of $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ to exclude dead cells. In order to remove cellular aggregates, cells were filtered through a $50\text{-}\mu\text{m}$ nylon mesh prior to analysis.

2.10. Flow Cytometry

All cell measurements were done using the Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Life Technologies). Unlysed blood samples were simultaneously stained with PE-CD34, FITC-CD45, and DCV. The filter combinations used consisted of a 555 DLP, BP 530/30 (FITC), and 620 DLP, 574/26 (PE). Acquisition was stopped when a minimum of 300 live-gated CD34+ events were collected. FITC, PE and DCV fluorescence was collected on a logarithmic scale. For DCV-based Side Population measurements, the filter combination consisted of 450/40 band-pass (blue), 603/48 band-pass (red), and 500 dichroic long-pass filters. DCV-Blue and DCV-Red fluorescence was displayed on a linear scale. Propidium iodide fluorescence was displayed on a logarithmic scale.

2.11. Statistical Analysis

Classic descriptive statistics were calculated for each parameter. Data are expressed as mean values \pm standard deviation. A two-way analysis of variation (ANOVA) (Holm-Sidak) was used to check the effect of treatment on the different sampling times of the study. One-way ANOVA (followed by Dunn or Turkey's *post hoc* methods depending on data conditions) was applied to compare the differences in only one of these factors. Calculations were employed by using SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc., San José, CA, USA).

3. RESULTS

3.1. Hematological Parameters

Hematological parameters with descriptive statistics are shown in Table 1. Blood counts showed significant differences in WBC, RBC, Hb, and PLT. For WBC, the UNT group showed higher counts than the entire experimental group ($22.56 \pm 5.33 \cdot 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) and significant differences ($p < 0.05$) were only found on day 1 with the HYP group ($11.13 \pm 2.35 \cdot 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$). HYP WBC counts on day 1 were significantly different from day 3 counts ($19.6 \pm 5.24 \cdot 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) and day 7 ones ($18.63 \pm 2.37 \cdot 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) ($p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively).

As expected, exercise training clearly increased red blood cells and hemoglobin concentration [26, 27], but without differences in red cell indexes, thus showing a mere quantitative adjustment in the oxygen transport capacity through the well-known erythropoietic response. This phenomenon is patent when comparing the values between UNT and all the rest of groups. As a general trend, the EHYP group showed an increase in RBC when compared to the CTRL group did on day 3. Significant differences were only found on day 7, when the EHYP ($8.54 \pm 0.16 \cdot 10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) and CTRL ($7.67 \pm 0.12 \cdot 10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) groups were compared ($p < 0.01$). In addition, the UNT group ($13.99 \pm 1.71 \text{ g}\cdot\text{dL}^{-1}$) showed lower Hb values in comparison with the EHYP group. Significant differences were only found on 7 ($16.7 \pm 0.42 \text{ g}\cdot\text{dL}^{-1}$) and 14 ($16.46 \pm 0.7 \text{ g}\cdot\text{dL}^{-1}$) days ($p < 0.05$).

For the PLT counts, the CTRL group on day 1 ($529.9 \pm 108.9 \cdot 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) was significantly different ($p < 0.05$) when compared with day 14 ($922.0 \pm 186.5 \cdot 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$). Significant differences were also found for the HYP group when day 1 ($450.8 \pm 86.5 \cdot 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) and day 7 ($980.7 \pm 54.0 \cdot 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$) were compared ($p < 0.001$).

Regarding Hc, the HYP group showed significant differences ($p < 0.05$) with the UNT group ($41.12 \pm 3.26\%$) on day 1 ($48.20 \pm 3.51\%$), day 7 ($50.14 \pm 6.76\%$) and day 14 ($47.48 \pm 3.73\%$). The EHYP group also showed significant differences on day 7 ($49.07 \pm 2.29\%$) and day 14 ($47.97 \pm 2.39\%$) when compared with the UNT group.

3.2. Identification of CD34+/CD45^{neg} and CD34+/CD45+ Cells

To evaluate the presence of CD34+ cell populations, serial analyses of unlysed whole blood from rats were performed, showing that DyeCycle Violet stain is selectively retained by CD34+ cells.

Table 1. Hematological parameters for the different experimental groups and times of sampling.

		WBC		RBC		Hb		Hc		MCV		MCH		MCHC		PLT	
		(10 ³ ·uL ⁻¹)		(10 ⁶ ·uL ⁻¹)		(g·dL ⁻¹)		(%)		(fL)		(pg)		(g·dL ⁻¹)		(10 ³ ·uL ⁻¹)	
Day 0	UNT	22,56	± 5,33	7,40	± 0,95	13,99	± 1,71	41,12	± 3,26	55,93	± 4,73	18,70	± 1,97	34,67	± 0,40	712,8	± 207,8
Day 1	CTRL	14,54	± 1,75	8,21	± 0,24	15,10	± 1,39	47,37	± 2,50	57,69	± 1,60	18,43	± 2,03	31,97	± 3,72	529,9	± 108,9
	HYP	11,13	± 2,35 ^e	8,26	± 0,53	15,95	± 1,62	48,20	± 3,51 ^e	58,38	± 2,33	19,33	± 1,50	33,13	± 2,75	450,8	± 86,5
	EHYP	12,18	± 1,63	8,01	± 0,32	15,25	± 0,91	45,87	± 0,38	57,34	± 2,77	19,04	± 0,52	33,26	± 2,25	650,6	± 84,9
Day 3	CTRL	15,12	± 2,90	7,70	± 0,19	15,18	± 0,56	46,33	± 2,52	60,19	± 4,06	19,71	± 0,89	32,81	± 0,92	769,6	± 79,4
	HYP	19,60	± 5,24 ^c	7,94	± 0,54	15,55	± 0,35	47,52	± 3,38	59,87	± 0,63	19,70	± 1,05	32,91	± 1,74	791,6	± 46,8
	EHYP	16,05	± 5,66	8,16	± 0,73	14,79	± 2,11	47,43	± 4,48	60,57	± 2,85	18,70	± 2,28	32,70	± 1,04	638,6	± 361,2
Day 7	CTRL	20,15	± 3,78	7,67	± 0,12	15,12	± 0,31	46,04	± 1,93	60,06	± 2,77	19,73	± 0,28	32,88	± 1,39	751,5	± 340,2
	HYP	18,63	± 2,37 ^a	8,18	± 0,37	14,76	± 3,34	50,14	± 6,76 ^e	61,56	± 11,09	17,95	± 3,56	30,27	± 9,52	980,7	± 54,0 ^a
	EHYP	16,52	± 3,38	8,54	± 0,16 ^g	16,70	± 0,42 ^e	49,07	± 2,29 ^e	57,47	± 2,54	19,57	± 0,32	34,07	± 1,13	904,2	± 158,6
Day 14	CTRL	16,18	± 2,39	8,07	± 0,27	15,68	± 0,39	45,19	± 0,58	56,05	± 1,51	19,46	± 0,74	34,71	± 0,78	922,0	± 186,5 ^b
	HYP	17,46	± 4,14	8,36	± 0,61	15,85	± 0,80	47,48	± 3,73 ^e	56,84	± 3,28	19,00	± 0,78	33,46	± 1,04	647,0	± 217,3
	EHYP	17,63	± 3,06	8,34	± 0,37	16,46	± 0,70 ^e	47,97	± 2,39 ^e	57,51	± 0,53	19,75	± 0,43	34,33	± 0,66	900,3	± 123,4

All data are given as mean ± standard error of the mean (SEM) on days 1, 3, 7 and 14. Multiple group comparisons were performed by using two-way analysis of variance. One-way ANOVA compared the experimental groups with UNT. Significant differences were shown as follows: p < 0.05: HYP on day 7 vs day 1 (a, p<0.05); CTRL on day 14 vs day 1 (b, p<0.05); UNT compared with other groups (e, p<0.05), HYP on day 3 vs day 1 (c, p<0.01); EHYP vs CTRL on day 7 (g, p<0.01), HYP on day 7 vs day 1 (n, p<0.001).

In general, CD34+/CD45^{neg} and CD34+/CD45⁺ cell counts were lower for the UNT group. Significant differences (p<0.05) were only observed when UNT CD34+/CD45⁺ cell counts (mean = 0.0135% of cells) were compared with day 3 of the CTRL group (mean = 0.0425% of cells) and with day 7 of the EHYP group (mean = 0.1532 % of cells).

For CD34+/CD45^{neg} cell counts (Fig. 1A), the EHYP group showed a significant increase on day 7 (mean = 0.0020% of cells) when compared with the CTRL (mean = 0.0003 % of cells) (p<0.001) and with the HYP group (mean = 0.0008 % of cells) (p<0.01). Significant differences (p<0.001) were also found when CD34+/CD45^{neg} cell counts for the EHYP group on day 7 were compared with day 1 (0 % of cells), day 3 (mean = 0.0001% of cells) and day 14 (mean = 0.00014% of cells).

All groups showed an increase of CD34+/CD45⁺ cells on day 7 than on day 3. On day 7, the EHYP group had significantly (p<0.05) higher cell counts (mean = 0.153% of cells) than the HYP group did (mean = 0.059 % of cells). In addition, the EHYP group had significant differences (p<0.05) when cell counts on day 3 and day 7 were compared (0,034 vs. 0.153% of cells, respectively).

3.3. DCV Staining Pattern

CD34⁺ cells showed a consistent differential DCV staining pattern. Based on both high and low DCV retention, CD34⁺ cells were classified as DCV^{high} and DCV^{low} subpopulations. Significant differences (p<0.05) were found for DCV^{low} cells on day 7, showing that CD34+/DCV^{low} EHYP cells had higher counts (mean = 0.107 % of cells) than

CD34+/DCV^{low} HYP cells did (mean = 0.036 % of cells). For the EHYP group, significant differences (p<0.05) were found when comparing days 3 and 7, with lower counts on day 3 (0.025 vs. 0.107% cells, respectively).

3.4. Side Population Measurements

Data collection for these cells was on days 1, 7 and 14 with a total of 32 samples of bone marrow (n=4 rats for each subgroup), which are shown in (Fig. 3). A representative scattergram and gating parameters used for quantification of SP population are shown in Fig. (4). No significant differences were found when SP cells were analyzed. In general, average cell counts on day 1 were 0.151 % of SP cells for the HYP group and 0.089% of SP cells for the EHYP group. By day 14, these counts had steadily decreased to 0.061% of cells for the HYP group and to 0.054% of cells for the EHYP group. The CTRL group had lower counts of SP cells on day 1 (mean = 0.021% of cells) and similar counts to the other groups on day 14 (mean = 0.057% of cells).

4. DISCUSSION

Whole-blood analyses, using no-lyse no-wash protocols enabled by acoustic focusing flow cytometry, have advantages over conventional, classic techniques commonly used for cell immunophenotyping. Red blood cell lysis can result in white cell depletion and incomplete cell lysing, making it difficult to study rare cells [28]. In addition, rat red blood cells are more lyse-resistant than human erythrocytes, making repeated and accurate flow cytometric measurements difficult. To avoid these problems, we decided to perform a series of rat cell measurements using acoustic focusing

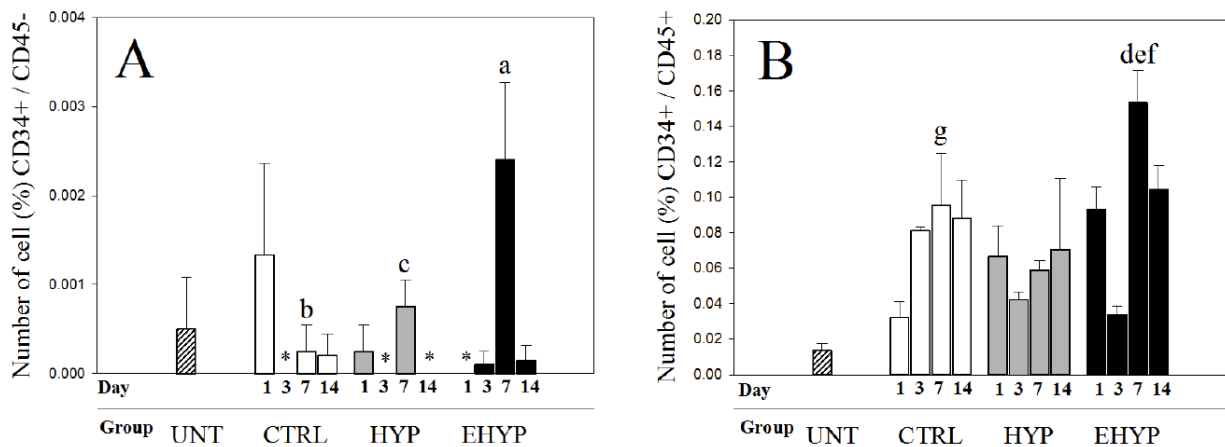


Fig. (1). Flow cytometry counting of CD34+/CD45- and CD34+/CD45+ cells for the different experimental groups and times of sampling. Untrained Rats (UNT), trained rats that suffered two consecutive trials of strenuous eccentric exercise protocol but had no other intervention (CTRL), Intermittent Hypoxia Group (HYP) and Exercise and Intermittent Hypoxia Group (EHYP) are represented. All data are given as mean \pm standard error of the mean (SEM) on days 1, 3, 7 and 14. Multiple group comparisons were performed by using two-way analysis of variance. One-way ANOVA compared the experimental groups with UNT. Flow cytometry values for undetectable events are represented with an asterisk (*). In Fig. (1A), significant differences are shown as follows: EHYP on day 7 compared with other sampling days (a; $p < 0.001$), CTRL vs. EHYP on day 7 (b, $p < 0.001$), and HYP vs. EHYP on day 7 (c, $p < 0.01$). In Fig. 1B, significant differences are shown as follows: EHYP vs. HYP on day 7 (d, $p < 0.05$), EHYP on day 7 vs. day 3 (e, $p < 0.05$), EHYP on day 7 vs. UNT (f, $p < 0.05$) and CTRL on day 7 vs. UNT (g, $p < 0.05$).

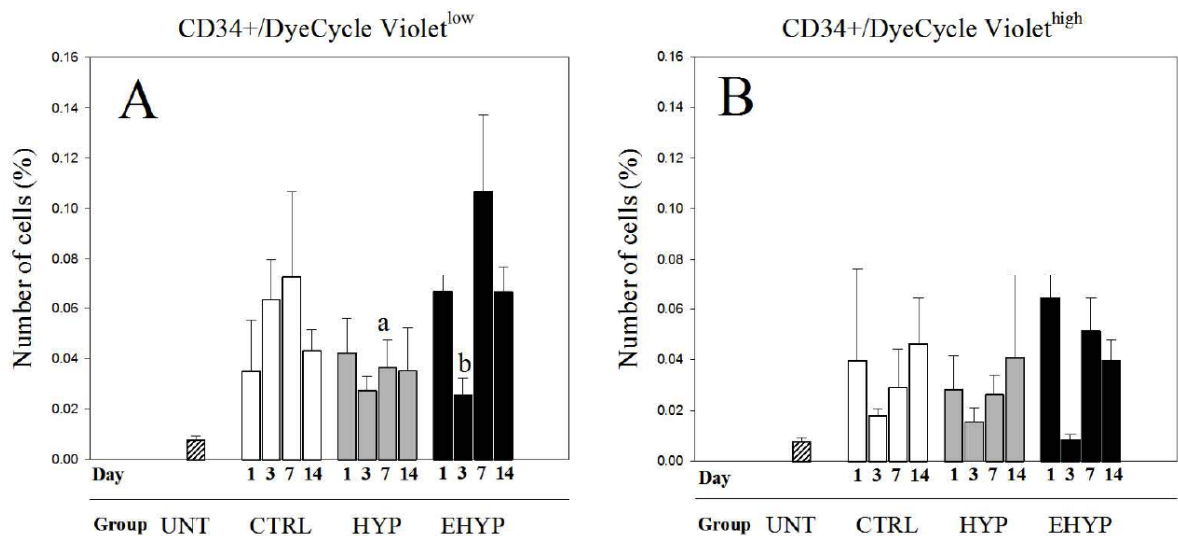


Fig. (2). Flow cytometry counting of CD34+/DyeCycle Violet^{low} and CD34+/DyeCycle Violet^{high} cells for the different experimental groups and time of sampling. Untrained Rats (UNT), trained rats that suffered the same strenuous eccentric exercise protocol but had no other intervention (CTRL), Intermittent Hypoxia Group (HYP) and Exercise and Intermittent Hypoxia Group (EHYP) are represented. All data are given as mean \pm standard error of the mean (SEM) on days 1, 3, 7 and 14. Multiple group comparisons were performed by using the two-way analysis of variance. One-way ANOVA compared the experimental groups with UNT. Significant differences were only found for CD34+/DyeCycle Violet^{low} cells, as follows: HYP vs. EHYP on day 7 (a, $p < 0.05$) and EHYP on day 3 vs. day 7 (b, $p < 0.05$).

cytometry in combination with methodology developed previously in our laboratory, aimed at detecting human CD34+ cells [29].

To distinguish nucleated blood cells from erythrocytes, we explored the possibilities of using a promising fluorescent probe termed Vybrant Dye Cycle Violet stain [30]. DCV can be excited with violet lasers and can be used for simultaneous staining with antibodies. DCV is a DNA-selective viable stain that can be easily adapted for functional stem cell analysis and side population assays.

First, we observed a consistent and reproducible dual-staining pattern of CD34+ cells. Based on DCV emission, we were able to identify two different CD34+ cell subsets. These two subsets were internally termed as CD34+/DCV^{high} and CD34+/DCV^{low}, referring to the bright or dim intensity of DCV staining. Interestingly, DCV is a substrate for multidrug resistance pumps expressed in hematopoietic stem cells. CD34+ cells are enriched in P-glycoprotein (P-gp) and, according our results, we hypothesize that DCV helps to discriminate primitive CD34+ stem cells with higher expression

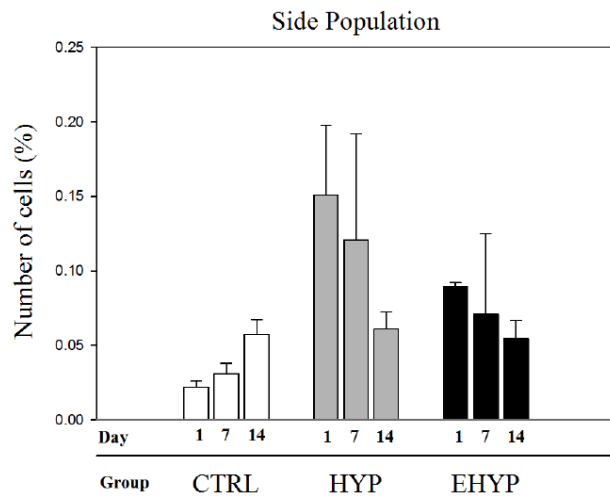


Fig. (3). Flow cytometry counting of side-population cells, for the different experimental groups and time of sampling. Trained rats that suffered the same strenuous eccentric exercise protocol but had no other intervention (CTRL), Intermittent Hypoxia Group (HYP), and Exercise and Intermittent Hypoxia Group (EHYP) are represented. All data are given as mean \pm standard error of the mean (SEM) on days 1, 7 and 14. Multiple group comparisons, using two-way analysis of variance, showed that non-significant differences were found.

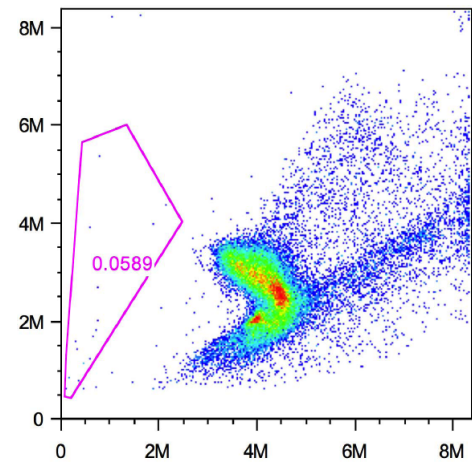


Fig. (4). Scatter gram for the side population. Representative scatter dot plot showing the side population and the gating parameters used for SP quantification.

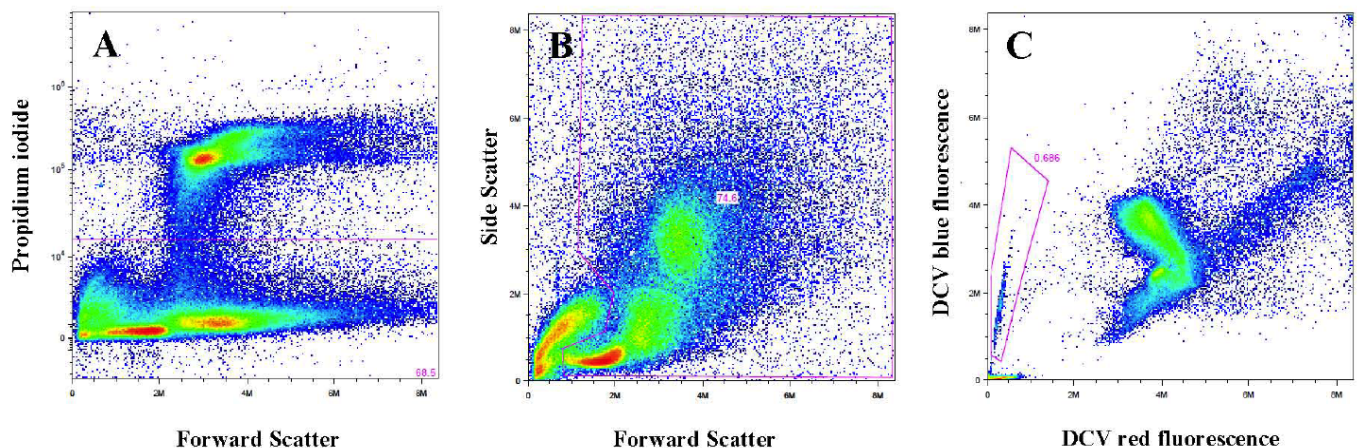


Fig. (5). Representative DyeCycle Violet SP analysis of rat marrow cells. Bone marrow cells were acquired on an Attune Acoustic Focusing cytometer (Life Technologies) equipped with a 50-mW violet laser emitting at 405 nm. Vybrant DyeCycle Violet stain (DCV), has emission characteristics similar to those of Hoechst 33342, but with a longer wavelength excitation maxima (369 nm), and it has been validated to study SP cells. The first dotplot displays Forward Scatter vs. propidium iodide events to exclude dead cells (A). The second dotplot displays the scatter properties of live gated events (B). Side population pattern of DCV efflux in the bone marrow of a representative rat (C).

levels of P-gp. If true, these results may have implications for the identification of CD34⁺ cells with different regenerative potential. In 1991, Chaudhary *et al.*, found that staining of human bone marrow cells with fluorescent dyes is potentiated by P-gp inhibitors and correlated inversely with P-gp expression [31]. Since P-gp is expressed in practically all hematopoietic progenitor cells, including long-term culture-initiating cells, they concluded that the highest levels of P-gp among the progenitors were associated with cells displaying characteristics of pluripotent stem cells. These results support our hypothesis that CD34⁺/DCV^{low} cells may also display characteristics of primitive progenitors, because DCV retention should also be inversely correlated with P-gp ex-

pression. Therefore, we decided to study the association of CD34⁺/DCV subsets with the experimental groups, showing that EHYP CD34⁺/DCV^{low} cells had higher counts than HYP CD34⁺/DCV^{low} cells did, and that EHYP CD34⁺/DCV^{low} cells had count that were more than 4 times higher on day 7 than on day 3. Since non-significant differences were observed for CD34⁺/DCV^{high} cells, we hypothesize that primitive CD34⁺ progenitors are preferentially mobilized under intermittent hypoxia, with a peak of CD34⁺/DCV^{low} cells under exercise and intermittent hypoxia conditions, on day 7. However, non-significant differences were found when SP cells were analyzed for the different experimental groups and time of sampling.

To date, the possible relationship between CD34+ and CD34^{neg} stem cells has not been clarified, although we know that there is a close relationship between improved skeletal muscle damage recovery and increased circulating CD34+ progenitors [32]. Previous studies showed that acute effects of intermittent normobaric hypoxia results in increased numbers of circulating hematopoietic stem cells immediately following exposure [11], whereas prolonged hypobaric hypoxia decreases endothelial circulating cells [33]. Rivier *et al.*, suggested that muscle SP cells are quiescent primitive progenitors that self-renew upon muscle injury and give rise to a progeny of satellite cells, which in turn participate more actively in muscle regeneration and repair [34]. This proposal was supported by subsequent studies [35]. However, our results suggest that intermittent hypobaric hypoxia, when accompanied by light aerobic exercise, has a sustained effect on the increase in the number of circulating progenitor cells, these findings are consistent with what would be expected from exercised animals and also demonstrate that the exercise was, in fact, probably have the desired repairing effects. The evolution of circulating progenitor cells in this group showed an independent trend to SP kinetics along recovery period. In addition, it is well known that vascular progenitor associated myogenic satellite cells in the embryo remain in close association with the vasculature as adult stem cells in skeletal muscle [36] and that bone marrow SP can participate in the formation of skeletal myotubes during regeneration [37]. Therefore, it was very important to observe the behavior of the SP under the experimental conditions of this study.

Interestingly, kinetics of CD34+/DCV progenitors and CD34^{neg} SP cells do not appear to be associated with the time of sampling. We have shown that early exposure to hypobaric hypoxia firstly increases the numbers of bone marrow SP cells on day 1, while under exercise and intermittent hypoxia conditions circulating progenitors are detected at high numbers on day 7.

On one hand, CD34^{neg} SP cells showed more cell numbers than the control group on day 1. In addition, the CD34+/DCV^{high} subset had a relevant decrease in cell numbers on day 3 when compared with day 1, whereas CD34^{neg} SP cells showed a more sustained decrease on day 7, when compared with day 1. On the other hand, the CD34+/DCV^{low} subset was detected at similar numbers from day 1 to day 14, whereas CD34+/DCV^{high} cells showed a significant decrease on day 3. Under exercise and intermittent hypoxia conditions, both CD34+/DCV subsets showed very similar kinetics, with a marked decrease in circulating progenitors on day 3, and restoration of cell counts on days 7 and 14. However, CD34^{neg} SP cells showed a different kinetic pattern, with a maximum of SP cells on day 1, and a steady decrease from day 7 to 14.

Taken together, these results suggest that intermittent hypoxia mainly triggers the expansion of CD34^{neg} SP cells, and has a less impact on CD34+ cell counts. Under this condition, CD34^{neg} SP cells were detected at a 3-fold higher level than in the control group. Inversely, exercise and intermittent hypoxia conditions resulted in significant changes in the numbers of circulating CD34+ cells, but little change in SP cell numbers. ABCG2 has a physiological role in the survival of hematopoietic stem cells under hypoxic conditions.

ABCG2 expression in side population stem cells protects against hypoxic environments by preventing the accumulation of porphyrin that causes mitochondrial death. The size of this protection increases as the amount of oxygen decreases, whereas the absence of ABCG2 renders progenitor cells highly sensitive to low oxygen tension [38]. In addition, ABCG2 is upregulated by hypoxia, a phenomenon that can explain why SP cells are detected at high levels as early as on day 1 after only one session of hypoxia exposure. Moreover, the ABCB1 gene is hypoxia responsive, a result that may identify hypoxia-elicited P-gp expression as a pathway for fast response under hypoxic conditions [39]. Although ABCB1 is overexpressed in CD34+ cells, intermittent hypoxia had no significant effects on the number of peripheral blood circulating progenitors. However the effects for the combination of exercise and intermittent hypoxia, suggest that muscle damage triggers mainly the mobilization of both CD34+/CD45^{neg} and CD34/CD45+ progenitors.

An explanation of the relevance of cells expressing CD34+ has been obtained throughout several studies. These include the CD34+/CD45+ phenotype hematopoietic progenitor cells with an important role in the skeletal muscle regeneration process [40, 41]; the CD34+/CD45^{neg} population with endothelial progenitor cells; and the angiogenesis and vascularization during this same recovery process [13, 17]. Therefore, based on the important role of both kinds of progenitor cells, we can postulate that combined intermittent hypobaric hypoxia exposure and exercise, offers a significant advantage in the recovery process, not only due to the higher count in progenitor cells found here, but also to the relative abundance of more primitive CD34+ cells.

CONCLUSION

The DyeCycle Violet stain is selectively retained by CD34+ cells, which allows discrimination of two subsets of cells, internally termed as CD34+/DCV^{high} and CD34+/DCV^{low}, due to the bright and dim intensity of the DCV stain.

On the 7th day of recovery after muscle damage, the EHYP group clearly increased the number of circulating CD34+/CD45^{neg} and CD34/CD45+ progenitors. Intermittent hypobaric hypoxia seems to be decisive in the expression of the side population, although the exercise-induced stimulus showed a reverse effect on SP kinetics. Further studies are needed in order to enlighten the role of side population in muscle regeneration.

Although our data offer promising perspectives for recovery from skeletal muscle damage, more translational research is needed to refine methods in a clinical setting. Later research using gene expression analysis and microstructural observation of the presumably damaged muscle will be critical for our enhanced understanding of the effects of hypoxia and exercise on the recovery process of skeletal muscle injury.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the DEP2010-22205-C02-01 grant from the Plan Nacional I+D+i 2008-2011 (Spain's Ministry of Economy and Competitiveness). This study was partially supported by the Spanish Ministry of Health (CP07/00098; PI08/1132) and from Life TechnologiesTM. The authors are very grateful to Michael W. Olszowy, Mike Ward, Clara Streiff, Sergio Ramón and Luca Tiengo from Life TechnologiesTM for all their help in this research field.

REFERENCES

- [1] Hoppeler H, Vogt M. Muscle tissue adaptations to hypoxia. *J Exp Biol* 2001; 204(18): 3133-9.
- [2] Faiss R, Leger B, Vesin J-M, *et al.* Significant Molecular and Systemic Adaptations after Repeated Sprint Training in Hypoxia. *PLoS One* 2013; 8(2): e56522.
- [3] Núñez-Espinosa C, Douzich A, Ríos-Kristjánsson JG, *et al.* Effect of intermittent hypoxia and exercise on blood rheology and oxygen transport in trained rats. *Respir Physiol Neurobiol* 2014; 192(1): 112-7.
- [4] Richalet JP, Bittel J, Herry JP, *et al.* Use of a hypobaric chamber for pre-acclimatization before climbing Mount Everest. *Int J Sports Med* 1992; 13 Suppl 1: S216-20.
- [5] Semenza GL, Shimoda LA, Prabhakar NR. Regulation of gene expression by HIF-1. In: *Novartis Foundation Symposium 272. Signalling Pathways in Acute Oxygen Sensing*. Chichester: Wiley 2006; pp. 2-14,33-6.
- [6] Rodríguez FA, Casas H, Casas M, *et al.* Intermittent hypobaric hypoxia stimulates erythropoiesis and improves aerobic capacity. *Med Sci Sports Exerc* 1999; 31(2): 264-8.
- [7] Casas M, Casas H, Pages T, *et al.* Intermittent hypobaric hypoxia induces altitude acclimation and improves the lactate threshold. *Aviat Space Environ Med* 2000; 71(2): 125-30.
- [8] Panisello P, Torrella JR, Esteva S, Pages T, Viscor G. Capillary supply, fibre types and fibre morphometry in rat tibialis anterior and diaphragm muscles after intermittent exposure to hypobaric hypoxia. *Eur J Appl Physiol* 2008; 103(2): 203-13.
- [9] Viscor G, Javierre C, Pages T, *et al.* Combined intermittent hypoxia and surface muscle electrostimulation as a method to increase peripheral blood progenitor cell concentration. *J Translat Med* 2009; 7: 91.
- [10] Miller-Kasprzak E, Jagodzinski PP. Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair. *Arch Immunol Ther Exp* 2007; 55(4): 247-59.
- [11] Serebrovskaya TV, Nikolsky S, Nikolska VV, Mallet RT, Ishchuk VA. Intermittent Hypoxia Mobilizes Hematopoietic Progenitors and Augments Cellular and Humoral Elements of Innate Immunity in Adult Men. *High Alt Med Biol* 2011; 12(3): 243-52.
- [12] Sarto P, Balducci E, Balconi G, *et al.* Effects of exercise training on endothelial progenitor cells in patients with chronic heart failure. *J Card Fail* 2007; 13(9): 701-8.
- [13] Ribeiro F, Ribeiro IP, Alves AJ, *et al.* Effects of exercise training on endothelial progenitor cells in cardiovascular disease: a systematic review. *Am J Phys Med Rehabil* 2013; 92(11): 1020-30.
- [14] Kurosaka M, Naito H, Ogura Y, Machida S, Katamoto S. Satellite cell pool enhancement in rat plantaris muscle by endurance training depends on intensity rather than duration. *Acta Physiol* 2012; 205(1): 159-66.
- [15] Cramer RM, Aagaard P, Qvortrup K, Langberg H, Olesen J, Kjaer M. Myofibre damage in human skeletal muscle: effects of electrical stimulation versus voluntary contraction. *J Physiol (Lond)* 2007; 583(1): 365-80.
- [16] Laufs U, Werner N, Link A, *et al.* Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 2004; 109(2): 220-6.
- [17] Wagatsuma A. Endogenous expression of angiogenesis-related factors in response to muscle injury. *Mol Cell Biochem* 2007; 298(1-2): 151-9.
- [18] Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo*. *J Exp Med* 1996; 183(4): 1797-806.
- [19] Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, *et al.* The ABC transporter Bcrp1/ABC2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 2001; 7(9): 1028-34.
- [20] Alvi AJ, Clayton H, Joshi C, *et al.* Functional and molecular characterisation of mammary side population cells *Breast Cancer Res* 2003; 5(1): R1-R8.
- [21] Meeson A, Fuller A, Breault DT, Owens WA, Richardson GD. Optimised Protocols for the Identification of the Murine Cardiac Side Population. *Stem Cell Rev and Rep* 2013; 9(5): 731-9.
- [22] Yano S, Ito Y, Fujimoto M, Hamazaki TS, Tamaki K, Okochi H. Characterization and localization of side population cells in mouse skin. *Stem Cells* 2005; 23(6): 834-41.
- [23] Barquinero J, Pellicer M, Petriz J. Therapeutic applications of stem-cells. *Med Clin* 2005; 124(13): 504-11.
- [24] Armstrong RB, Ogilvie RW, Schwane JA. Eccentric Exercise-Induced Injury to Rat Skeletal-Muscle. *J Appl Physiol* 1983; 54(1): 80-93.
- [25] Petriz J. Flow cytometry of the side population (SP). In: *Robinson JP, Manag Ed. Current protocols in cytometry*. London: John Wiley & Sons, Inc. 2013; *Curr Protoc Cytom* 64:9.23.1-9.23.20.
- [26] Goldberg AP, Geltman EM, Hagberg JM, *et al.* Therapeutic benefits of exercise training for hemodialysis patients. *Kidney Int Suppl* 1983; 16: S303-9.
- [27] Schmidt W, Maassen N, Trost F, Böning D. Training induced effects on blood volume, erythrocyte turnover and haemoglobin oxygen binding properties. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1988; 57(4): 490-8.
- [28] Fritsch G, Printz D, Stimpfl M, *et al.* Quantification of CD34+ cells: comparison of methods. *Transfusion* 1997; 37(8): 775-84.
- [29] Fornas O, Garcia J, Petriz J. Flow cytometry counting of CD34+ cells in whole blood. *Nat Med* 2000; 6(7): 833-6.
- [30] Telford WG, Bradford J, Godfrey W, Robey RW, Bates SE. Side population analysis using a violet-excited cell-permeable DNA binding dye. *Stem Cells* 2007; 25(4): 1029-36.
- [31] Chaudhary P, Mechetner E, Roninson I. Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood* 1992; 80: 2735-9.
- [32] Hollemann D, Budka H, Löscher WN, Yanagida G, Fischer MB, Wanschitz JV. Endothelial and myogenic differentiation of hematopoietic progenitor cells in inflammatory myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008; 67(7): 711-9.
- [33] Mancuso P, Peccatori F, Rocca A, *et al.* Circulating endothelial cell number and viability are reduced by exposure to high altitude. *Endothelium* 2008; 15(1-2): 53-8.
- [34] Rivier F, Alkan O, Flint AF, *et al.* Role of bone marrow cell trafficking in replenishing skeletal muscle SP and MP cell populations. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 10): 1979-88.
- [35] Dubinska-Magiera M, Zaremba-Czogalla M, Rzepecki R. Muscle development, regeneration and laminopathies: how lamins or lamina-associated proteins can contribute to muscle development, regeneration and disease. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70(15): 2713-41.
- [36] De Angelis L, Berghella L, Coletta M, *et al.* Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J Cell Biol* 1999; 147(4): 869-78.
- [37] Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, *et al.* Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999; 401(6751): 390-4.
- [38] Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, *et al.* The stem cell marker Bcrp/ABC2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem* 2004; 279(23): 24218-25.
- [39] Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res* 2002; 62(1): 3387-94.
- [40] Abedi M, Foster BM, Wood KD, *et al.* Haematopoietic stem cells participate in muscle regeneration. *Br J Haematol* 2007; 138(6): 792-801.
- [41] Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL, Wagers AJ. Determinants of skeletal muscle contributions from circulating cells, bone marrow cells, and hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 2004; 22(7): 1292-304.

PUBLICACIÓN III

“Vybrant DyeCycle Violet stain discriminates two
different subsets of CD34+ cells”

Vybrant DyeCycle Violet stain discriminates two different subsets of CD34+ cells.

Authors:

Cristian Núñez-Espinosa (a), María Dolores García-Godoy (b), Inês Ferreira (a), Juan Gabriel Ríos-Kristjánsson (a), David Rizo-Roca (a), Laura G. Rico (b), Gerard Rubi-Sans (b), Carlos Palacio (b), Joan Ramon Torrella (a), Teresa Pagès (a), Ginés Viscor (a), Jordi Petriz (b).

(a) Departament de Fisiologia i Immunologia, Universitat de Barcelona.

(b) Vall d'Hebron Institut de Recerca, Barcelona.

Running title:

DCV subsets and orders CD34+ cells

Keywords:

Stem cells, CD34, Vybrant DyeCycle Violet, P-glycoprotein, Flow Cytometry.

Corresponding author:

Jordi Petriz, PhD

Laboratori 207

Vall d'Hebron Institut de Recerca

Pº Vall d'Hebron 119-129 08035 Barcelona

tel: +34 932 746 873

fax: +34 934 746 873

email: jordi.petriz@vhir.org

Abstract.

Introduction: CD34 studies are needed to understand the role of these cells in regard to efficient engraftment, especially in the adjuvant treatment of cancer.

Material and Methods: We have used a modified method for counting CD34+ cells in unlysed whole blood samples, based on the DNA-selective and cell membranepereant Vibrant DyeCycle Violet stain.

Results: CD34+ cells exhibit a consistent and differential Vybrant Dye Cycle Violet staining pattern. Based on their different DCV intensity, we termed these two subpopulations as CD34+/DCVhigh and CD34+/DCVlow cells, and in general, DCVhigh

cells were 12-times brighter when compared with DCVlow cells.

Conclusions: DCV effectively subsets and orders CD34+ cells for the definition of different functional properties that can be related to the characterization, resolution, and purification of primitive hematopoietic stem cells in combination with specific useful markers for multicolor flow cytometric measurements.

1. Introduction

The antigen recognized by the CD34 antibody is a cell surface marker widely used to both identify and isolate hematopoietic progenitor cells. Although this marker was initially identified as an antigen expressed in hematopoietic progenitor cells (1,2), it has also been used to detect CD34+ leukemic cells, vascular endothelial cells (3,4), and tissue-specific stem cells including muscle satellite cells and epidermal precursors (5-7). In 1998, Berenson *et al.* showed for the first time that CD34+ marrow cells engrafted lethally irradiated baboons (8). Three years later, it was suggested that CD34+ marrow cells were also capable of reconstituting hematopoiesis in humans (9). Nine patients with breast cancer or neuroblastoma were treated with myeloablative therapy and then reconstituted with autologous CD34+ marrow cells. This study provided evidence that CD34+ human marrow cells can reconstitute hematopoiesis *in vivo* after marrow ablative therapy. Since then, a number of CD34 studies added significantly to our understanding of the role of these cells in regard to efficient engraftment, especially in the adjuvant treatment of cancer.

Flow cytometry has classically been used to detect CD34+ cells. First assays consisted of using indirect immunofluorescence techniques, red-cell lysing procedures, and centrifugation and washing steps. CD34+ counts were obtained using a dual-platform technique, also known as the Milan Protocol (10). Since then, different methodologies have been described for improved detection of CD34+ cells. In concert with the International Society of Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE), a set of guidelines were defined for detection of CD34+ cells based on a multiparametric flow cytometry method. CD45 staining, fluorescent microspheres and viability dyes were included to demonstrate that both viable and nonviable CD34+ cells could be identified and quantified (11,12). More recently, the CD14/CD11b protocol was also validated for progenitor cell counting (13).

We previously developed a new method for counting CD34+ cells in whole blood samples, based on nucleic acid viable staining to discriminate erythrocytes and debris. After nucleic acid staining, DNA/RNA-positive events are plotted in size/granularity scatter plots. These events can be 'live-gated' for the analysis of CD34+ events. This procedure uses either single- or multiple-laser excitation. It is simple, fast, highly sensitive and reproducible avoids lysis, washing and centrifugation steps and takes advantage of classic methods that are widely used in flow cytometry (14). The original protocol used SYTO-13, a fluorescent DNA/RNA stain in avoiding erythrocyte lysis. One approach described the determination of surface antigens on unfixed leukocytes in whole blood by using the laser dye styryl-751 (LDS-751) nucleic acid stain to discriminate intact nucleated cells from non-nucleated and damaged nucleated cells. However, we compared staining of viable nucleated white cells by SYTO-13 and LDS-751, and obtained a more uniform staining pattern with SYTO-13.

More recently, a new assay based on the efflux of Vybrant DyeCycle Violet stain (DCV) was shown to stain viable nucleated cells. DCV is a low cytotoxicity permeable DNA-specific dye that can be used for cell cycle analysis and stem cell side population by flow cytometry (15,16). In order to discriminate nucleated blood cells from erythrocytes, we explored the use of DCV, because it can be excited with violet lasers and can be used for simultaneous staining with antibodies. We have adapted this protocol to study the numbers of circulating CD34+ cells in rat peripheral blood, because rat erythrocytes have increased resistance to osmotic lysis, making our method ideal for such research studies. In addition, we applied this newly modified methodology for human CD34+ progenitor cell counting.

2. Material and methods

This study was jointly conducted by the Department of Physiology and Immunology at the University of Barcelona (UB) and the Vall d'Hebron Research Institute (VHIR) in Barcelona.

2.1. Rat samples

In this study we used rat peripheral blood cells. Rat blood cells were obtained from 53 adult male Sprague Dawley rats taken for hypoxic training studies, under different experimental conditions. The experimental basal conditions consisted of Untrained Rats (UNT), that were not subjected to any intervention or training; Control Group (CTRL) of trained rats that suffered muscle damage but had no other intervention (passive recovery); Intermittent Hypoxia Group (HYP) trained rats that were exposed to intermittent hypobaric hypoxia sessions after the muscle-damage protocol; and Exercise and Intermittent Hypoxia Group (EHYP) trained rats that were subjected to intermittent hypobaric hypoxia sessions plus a rehabilitation exercise program constituted by with light aerobic exercise sessions after the muscle-damage procedure. Samples were processed immediately after collection. All procedures were performed in accordance with the internal protocols of our laboratory, that were authorized by the University of Barcelona's Ethical Committee for Animal Experimentation and ratified, in accordance with current Spanish legislation, by the Departament de Medi Ambient i Habitatge (file #1899) of the Autonomous Government of Catalonia.

2.2. Human samples

Human blood samples (n=27) were obtained from samples taken for clinical testing purposes not related to this study. Peripheral blood, mobilized peripheral blood, and bone marrow specimens were used in this study. Blood and marrow specimens were obtained from healthy donors and cancer patients with informed consent. All samples were processed immediately after collection.

2.3. Flow cytometry.

Anticoagulated blood containing 5×10^5 cells ($\approx 50 \mu\text{L}$), were incubated in the presence PE-CD34 and FITC-CD45 antibodies (Life Technologies), as recommended by the manufacturer. Vybrant DyeCycle Violet stain (DCV, Life Technologies) was added after a 15 min incubation at a final concentration of $10 \mu\text{M}$. Cell-incubation was stopped after 5 min, and blood cells were diluted using Attune® 1X focusing fluid (1/8 v/v), prior to sample acquisition.

All cell measurements were done using the Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Life Technologies). Unlysed blood samples were simultaneously stained with PE-CD34, FITC-CD45, and DCV. The filter combination used consisted of 555 DLP, 530/30 (FITC), and 620 DLP, 574/26 (PE). Acquisition was stopped when a minimum of a 300 live-gated CD34+ events were collected. FITC, PE and DCV fluorescence were collected in logarithmic scale.

Gating strategy is represented in Figure 1. A CD45 versus DCV dot plot (R1) was used to discriminate nucleated cells from erythrocytes and debris. Nucleated cells were then selected in a side scatter versus CD45 dot plot (R2). CD34+ subpopulations (R3) with different DCV levels were selected using a DCV vs. CD34 dot plot (R4). Side scatter vs. forward scatter plots were used again to count a minimum of 300 CD34+ cells (R5).

3. Results

CD34+ cells exhibit a consistent and differential Vybrant Dye Cycle Violet staining pattern.

Panels of immunomarkers provide greater information in combination with functional analysis of unlysed whole blood specimens. In order to evaluate the presence of CD34+ cell populations, we performed serial analyses of unlysed whole blood from rats, showing that CD34+ cells differentially retained DyeCycle Violet stain (Figure 1). The distribution of DCV-stained CD34+ cells helped to identify two main cluster groups, with significantly different fluorescent intensities. Based on their different DCV intensity, we termed these two subpopulations as CD34+/DCV^{high} and CD34+/DCV^{low} cells, and in general, DCV^{high} cells (R6) were 12-times brighter when compared with DCV^{low} cells (R4).

With regard to rat progenitor cells, reference counts for CD34+/DCV^{low} were found to be higher under exercise and intermittent hypoxia (mean = 0.107%), when compared with CD34+/DCV^{low} cells under intermittent hypoxia (mean = 0.036%). For the exercise and intermittent hypoxia group, lower counts were found on day 3 (mean = 0.025%) when compared with day 7 (mean = 0.107%) (data not shown). In Figure 2, four representative experiments of CD34+/DCV^{high} and CD34+/DCV^{low} cells are shown. DCV stain was used to display CD34+/DCV^{high} cell in Region 6 (R6) and CD34+/DCV^{low} cells in Region 4 (R4).

Since DCV allowed the identification of relevant and reproducible CD34+/DCV^{high} and CD34+/DCV^{low} rat cells, studied unlysed whole blood specimens obtained from humans. The presence of these two subsets was also evaluated in human hematopoietic specimens. Normal peripheral blood, mobilized peripheral blood and human marrow also showed CD34+/DCV^{high} and CD34+/DCV^{low} cells. CD34+/DCV^{high} and CD34+/DCV^{low} cells were also detected, showing a similar pattern to those observed in rats. Figure 3 shows four representative CD34+/DCV measurements. The first dot plot was used to show CD34+/DCV rat cells (A), whereas the remaining were used to show CD34+/DCV human cells (B-D). The second dotplot (B) was used to display peripheral blood circulating cells during steady-state hematopoiesis. The subsequent dot plots represent two marrow specimens, showing normal bone marrow (C) and a malignant disease of the bone marrow (D) in which hematopoietic precursors are arrested in an

early stage of development with low CD34 expression (acute myeloid leukemic cells). Normal bone marrow CD34⁺ cells also showed differences in DCV staining, and brighter CD34⁺ cells had the lowest DCV retention (C). When compared with peripheral blood CD34⁺/DCV cells, CD34^{bright} marrow cells had even less DCV retention. Acute myeloid CD34^{dim} blast cells in (D) were DCV^{high}, whereas a minor subset of CD34^{bright} cells, were DCV^{low}, as indicated by arrows and labels.

4. Discussion

We have used a modified method for counting CD34+ cells in whole blood samples, based on the DNA-selective and cell membrane-permeant Vibrant DyeCycle Violet stain (16). This protocol was initially adapted to study the numbers of circulating CD34+ cells in rats (manuscript submitted). Later it was applied for CD34+ counting in human peripheral blood and marrow cell specimens. We resorted to use this method because rat erythrocytes have increased resistance to osmotic lysis, making our method ideal for such research studies. After nucleic acid staining, DNA positive events were gated in size/granularity scatterplots, and subsequently these events were “live-gated” for the analysis of CD34+ events. Surprisingly, the results of this approach were unexpected; based on different DCV intensity, we obtained two different subpopulations of CD34+ cells, that we classified as CD34+/DCV^{high} and CD34+/DCV^{low} cells.

In 1991, Udomsakdi et al. identified different subsets of primitive human hematopoietic cells defined by different functional assays. They used rhodamine 123 (Rh123) and CD34 antibodies to allow the CD34+ cells to be divided into two subpopulations (17). Isolation of CD34+ Rh123-dull cells provided a single-step enrichment of approximately 240-fold in long-term culture-initiating cells by comparison to the light-density fraction of normal bone marrow. Moreover, clonogenic cells present in the CD34+ Rh123-bright fraction were enriched approximately 40-fold over their concentration in the light-density fraction. Human hematopoietic stem cells are enriched in the Lin^{neg} CD34+/CD38^{neg} cell fraction, as assessed by the functional SCID-repopulating cell (SRC) assay; and, low Rh123 retention identifies long-term human hematopoietic stem cells within the Lin^{neg} CD34+/CD38^{neg} population. This study concluded that this improved protocol was a significant step toward achieving a more homogeneous population of primitive cells for both experimental and therapeutic applications (18). This was somewhat of a paradigm shift because studies in murine systems suggest that purification of homogeneous hematopoietic stem cell populations may not be possible as stem cells may be stochastically regulated by random intrinsic and extrinsic factors (19).

Also in 1991, Chaudhary and Roninson demonstrated that the highest levels of P-glycoprotein (P-gp) among the progenitors were associated with cells displaying characteristics of pluripotent stem cells (20). Rh123 and several other fluorescent dyes are substrates for transport mediated by P-gp, an efflux pump responsible for multidrug resistance in tumor cells. They found that staining of human bone marrow cells with fluorescent dyes was potentiated by P-gp inhibitors and inversely correlated with P-gp expression as P-gp is expressed in practically all hematopoietic progenitor cells, including long-term culture-initiating cells.

Interestingly, DCV is a P-glycoprotein substrate (21) that can also be used for Side Population measurements (15,16). Our results suggest that DCV can also be used to divide CD34⁺ cells into two populations, as previously demonstrated by using rhodamine 123, and that these subpopulations may overlap the clonogenic capacity of both Rh123-dull and -bright CD34⁺ cells. If true, CD34⁺/DCV^{low} cells should also be enriched in long-term human hematopoietic stem cells, making this protocol useful to monitor the frequency of these two subpopulations after stem cell mobilization and their association with long-term reconstitution, engraftment, and graft failure. Since panels of immunomarkers provide greater information in combination with functional analysis of unlysed whole blood specimens, further experiments will be needed to learn how Lin^{neg} CD34⁺/CD38^{neg} and other marker combinations can help to identify true hematopoietic stem cells, and how the lowest DCV retention is associated or not with more primitive progenitor marrow cells. Regarding the staining technique, DCV has advantages over Rh123, because the amount of electronic compensation required to eliminate the Rh123 spillover into either the PE-CD34 or the Lin^{neg} CD34⁺/CD38^{neg} channel can overcome the capacity of the instrument, making it difficult to effectively lower the intensity of Rh123 fluorescence by reducing the concentration, especially for multicolor immunofluorescence and flow cytometry based hematopoietic stem cell assessment. Moreover, our results in this study demonstrate that DCV can also help to distinguish the activity of multidrug transporters expressed in leukemic CD34⁺ cells as we have shown that AML CD34⁺ blasts can have an increased retention of DCV in contrast to CD34^{bright} marrow cells, which also could help to identify normal and malignant progenitors, based on the functional activity and the expression of multidrug transporters. In essence, we believe that DCV effectively subsets and orders CD34⁺ cells for the definition of different functional properties that can be related to the

characterization, resolution, and purification of primitive hematopoietic stem cells in combination with specific useful markers for multicolor flow cytometric measurements. Violet laser diodes are now available on many benchtop flow cytometers, a factor that will be key to enlighten the relevance of this promising probe for clinical stem cell counting.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest to disclose.

Figure legends

Figure 1. Representative gating strategy to study the numbers of circulating CD34+ cells in rat peripheral blood. A CD45 versus DCV dot plot (R1) was used to discriminate nucleated cells from erythrocytes and debris. Nucleated cells were then selected in a side scatter versus CD45 dot plot (R2). CD34+ subpopulations (R3) with different DCV levels were selected using a DCV vs. CD34 dot plot (R6). Side scatter vs. forward scatter plots were used again to count a minimum of 300 CD34+ cells (R5).

Figure 2. Flow cytometric profile of CD34+/DCV^{low} and CD34+/DCV^{high} cells. DyeCycle Violet analysis of four representative experiments showing CD34+/CD45+ cells on an Attune® Acoustic Focusing cytometer (Life Technologies) equipped with a 50 mW violet laser emitting at 405 nm. Vybrant® DyeCycle™ Violet stain (DCV) was used to display CD34+/DCV^{low} cells (R4), which can be enriched in primitive hematopoietic stem cells, as indicated by arrows and labels.

Figure 3. Representative CD34+/DCV measurements in peripheral blood and marrow cells using flow cytometry. The first dotplot displays CD34+/DCV rat cells (A), to be compared with CD34+/DCV human cells (B-D). b) Peripheral blood circulating cells during steady-state hematopoiesis. C) Normal bone marrow. D) Malignant disease of the bone marrow with low CD34 expression (acute myeloid leukemic cells). Normal bone marrow CD34+ cells show differences in DCV staining, and brighter CD34+ cells have the lowest DCV retention. When compared with peripheral blood CD34+/DCV cells, CD34^{bright} marrow cells had even less DCV retention. Acute myeloid CD34^{dim} blast cells are DCV^{high}, whereas CD34^{bright} cells, are DCV^{low}.

Acknowledgments

This study was partially supported by DEP2010-22205-C02-01 grant from the Plan Nacional I+D+i 2008-2011 (Spain's Ministry of Economy and Competitiveness), by the Spanish Ministry of Health (CP07/00098; PI08/1132) and from Life Technologies™. The authors are very grateful to Michael W. Olszowy, Michael D. Ward, Clara Streiff, Sergio Ramón and Luca Tiengo from Life Technologies™ for all their help in this research field.

References

1. Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID. Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood* 1986;67(3):842-5.
2. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 1984;133(1):157-65.
3. Baumhueter S, Dybdal N, Kyle C, Lasky LA. Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood* 1994;84(8):2554-65.
4. Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 1990;75(12):2417-26.
5. Nielsen JS, McNagny KM. Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci* 2008;121(Pt 22):3683-92.
6. Suda T, Arai F, Shimmura S. Regulation of stem cells in the niche. *Cornea* 2005;24(8 Suppl):S12-S17.
7. Fujimaki S, Machida M, Hidaka R, Asashima M, Takemasa T, Kuwabara T. Intrinsic ability of adult stem cell in skeletal muscle: an effective and replenishable resource to the establishment of pluripotent stem cells. *Stem Cells Int* 2013;2013:420164.
8. Berenson RJ, Andrews RG, Bensinger WI, Kalamasz D, Knitter G, Buckner CD, Bernstein ID. Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J Clin Invest* 1988;81(3):951-5.
9. Berenson RJ, Bensinger WI, Hill RS, Andrews RG, Garcia-Lopez J, Kalamasz DF, Still BJ, Spitzer G, Buckner CD, Bernstein ID and others. Engraftment after infusion of CD34+ marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma. *Blood* 1991;77(8):1717-22.
10. Siena S, Bregni M, Brando B, Belli N, Ravagnani F, Gandola L, Stern AC, Lansdorp PM, Bonadonna G, Gianni AM. Flow cytometry for clinical

- estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients. *Blood* 1991;77(2):400-9.
11. Sutherland DR, Keating A, Nayar R, Anania S, Stewart AK. Sensitive detection and enumeration of CD34+ cells in peripheral and cord blood by flow cytometry. *Exp Hematol* 1994;22(10):1003-10.
 12. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother* 1996;5(3):213-26.
 13. Marin P, Jover L, Petriz J. A new approach to CD34+ hematopoietic progenitor cell counting. *Curr Stem Cell Res Ther* 2013;8(2):163-71.
 14. Fornas O, Garcia J, Petriz J. Flow cytometry counting of CD34+ cells in whole blood. *Nat Med* 2000;6(7):833-6.
 15. Petriz J. Flow cytometry of the side population (SP). *Curr Protoc Cytom* 2013;Chapter 9:Unit9 23.
 16. Telford WG, Bradford J, Godfrey W, Robey RW, Bates SE. Side population analysis using a violet-excited cell-permeable DNA binding dye. *Stem Cells* 2007;25(4):1029-36.
 17. Udomsakdi C, Eaves CJ, Sutherland HJ, Lansdorp PM. Separation of functionally distinct subpopulations of primitive human hematopoietic cells using rhodamine-123. *Exp Hematol* 1991;19(5):338-42.
 18. McKenzie JL, Takenaka K, Gan OI, Doedens M, Dick JE. Low rhodamine 123 retention identifies long-term human hematopoietic stem cells within the Lin-CD34+CD38- population. *Blood* 2007;109(2):543-5.
 19. Benveniste P, Cantin C, Hyam D, Iscove NN. Hematopoietic stem cells engraft in mice with absolute efficiency. *Nat Immunol* 2003;4(7):708-13.
 20. Chaudhary PM, Roninson IB. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* 1991;66(1):85-94.
 21. Boesch M, Reimer D, Rumpold H, Zeimet AG, Sopper S, Wolf D. DyeCycle Violet used for side population detection is a substrate of P-glycoprotein. *Cytometry A* 2012;81(6):517-22.

Figure 1

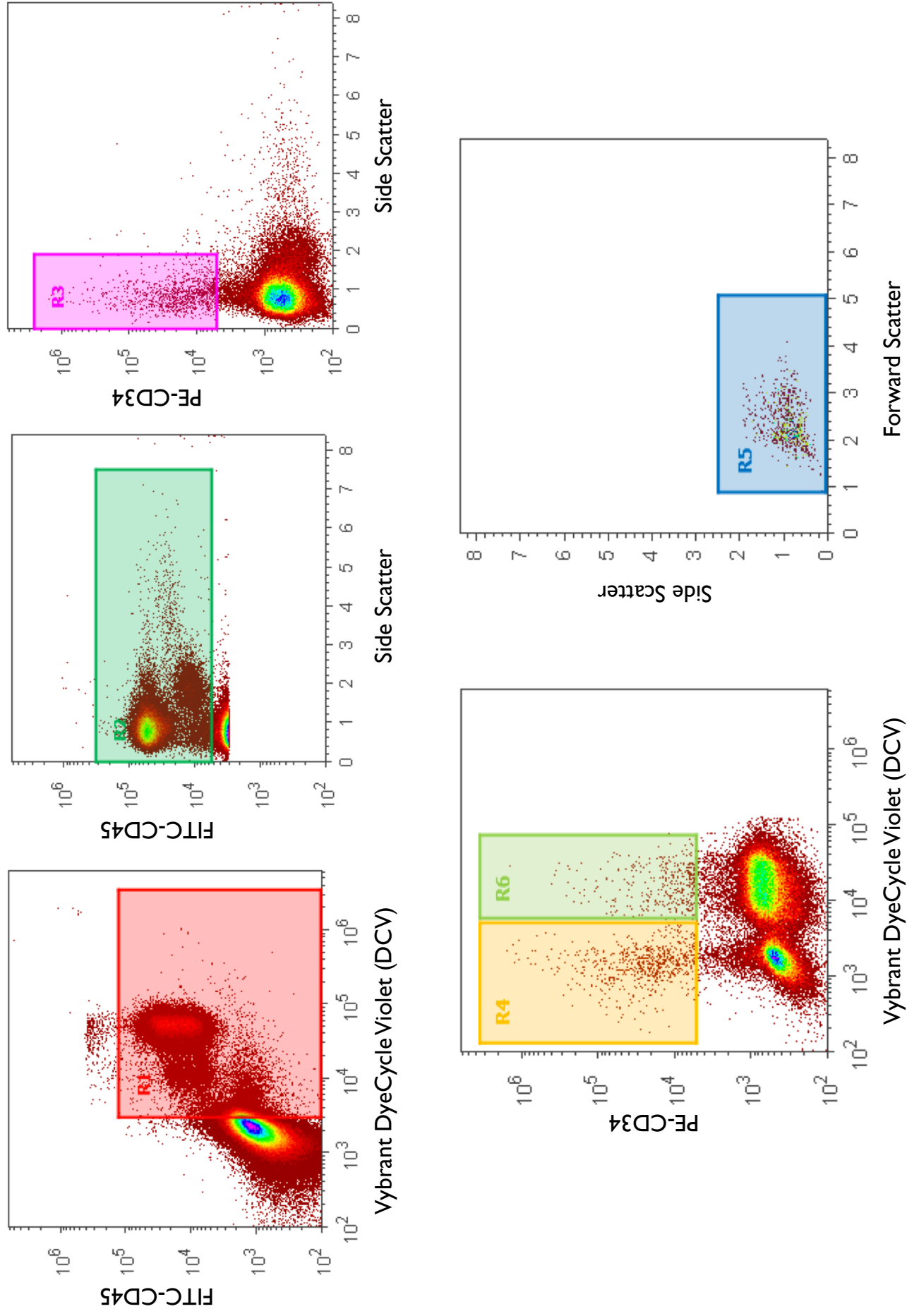


Figure 2

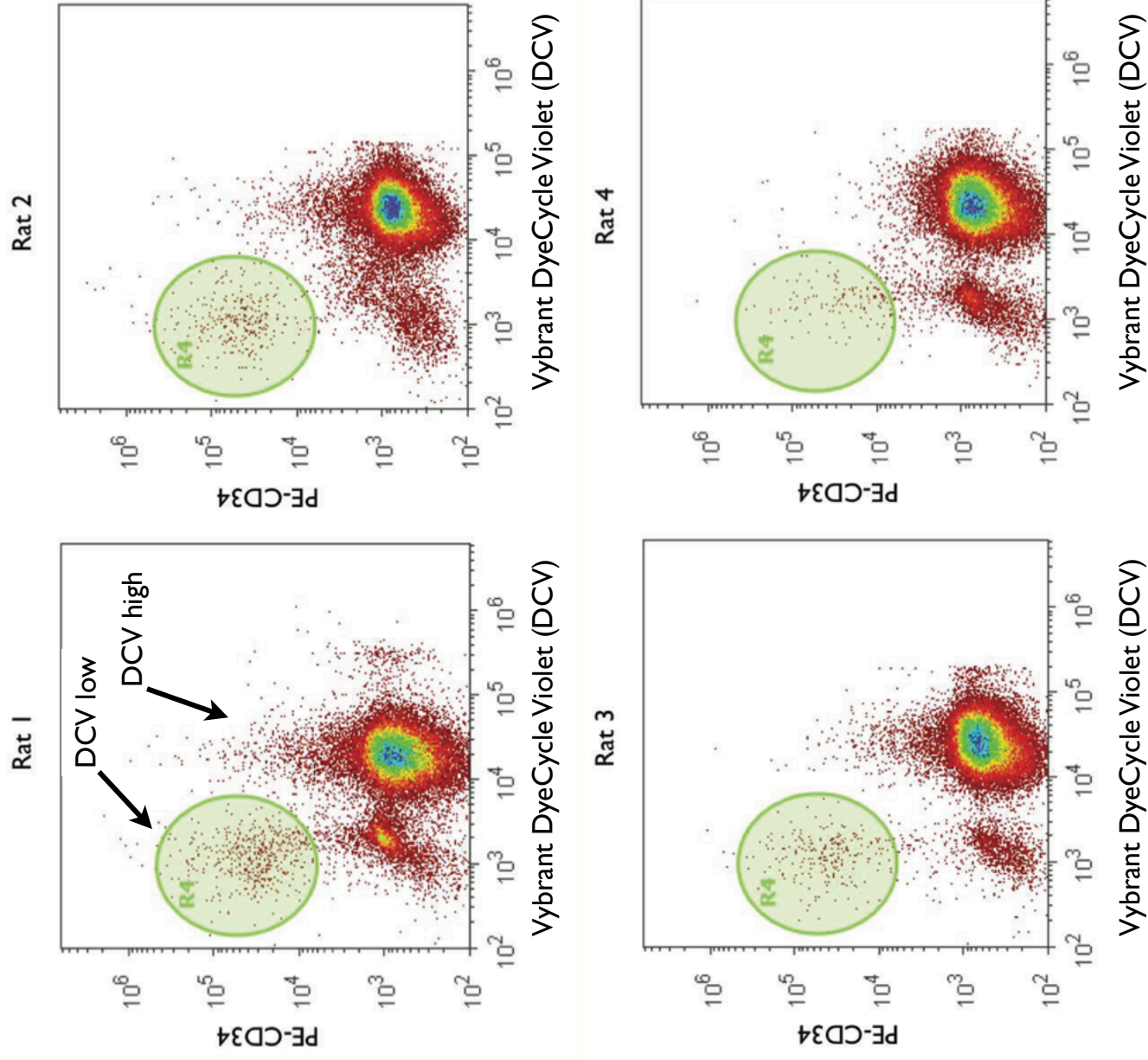
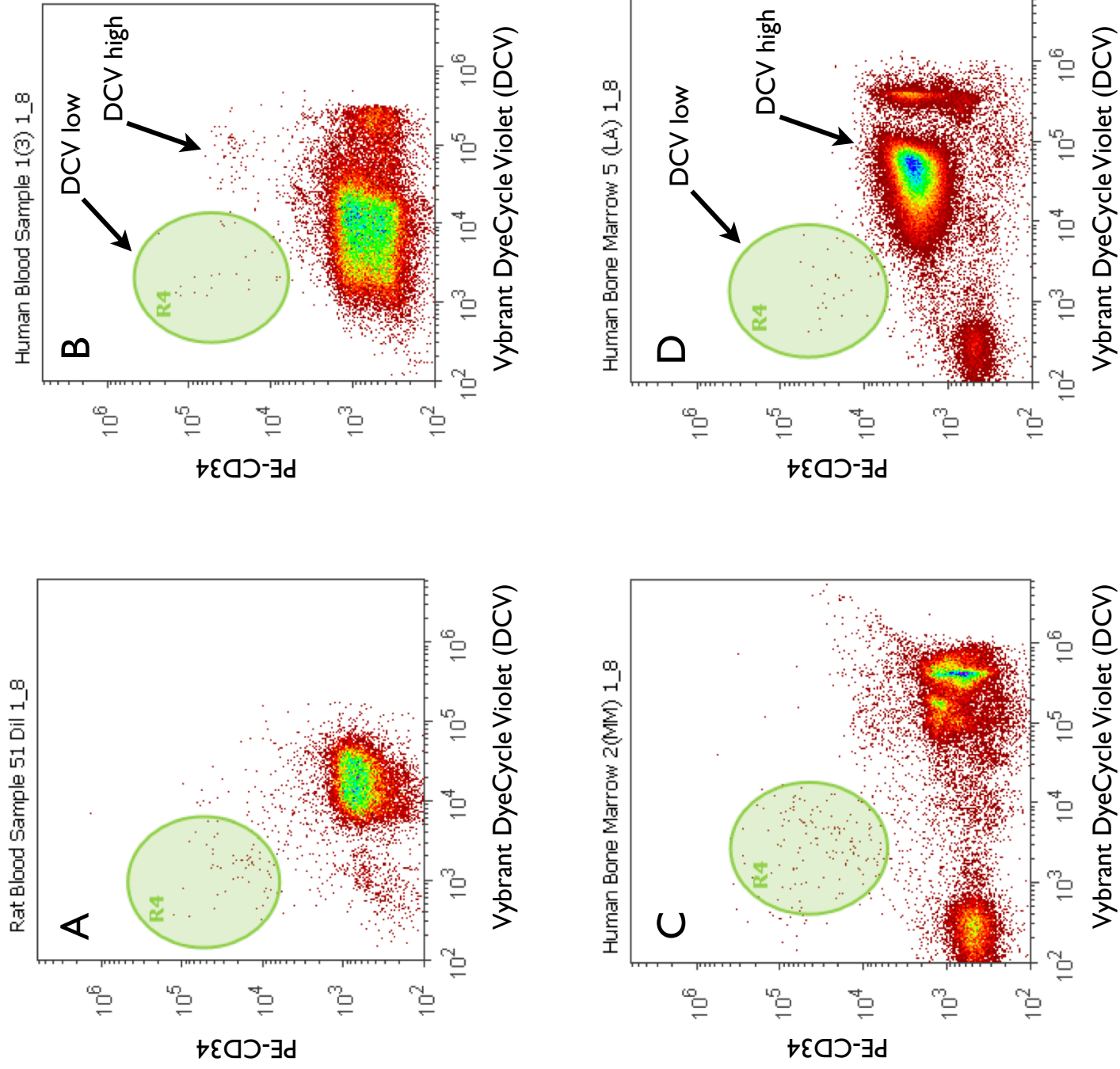


Figure 3



PUBLICACIÓN IV

“Regulatory role of hypoxia on side population cells
dynamics”

Regulatory role of hypoxia on side population cells dynamics

Cristian Núñez-Espinosa¹, Joan Ramon Torrella¹, Teresa Pagès¹, Jordi Pétriz^{2,3} & Ginés Viscor¹

¹Departament de Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. ²Vall d'Hebron Institut de Recerca, Barcelona, Spain.

³Josep Carreras Leukemia Research Institute, Barcelona, Spain.

Abstract

The side population (SP) cell groups are present in most tissues studied to date. The characteristics of the SP, especially its high differentiation and action of efflux through their multidrug transporters (ABCG2 and P-gp) make them a vital cell group in the study of cancer, as well as the development of new alternatives in tissue regeneration. Hypoxia has been determined as an important factor in the preservation and increase of SP cells in the organism, which directly affects cellular vital cycle. The purpose of this mini-review is to highlight the critical regulatory role of hypoxia on SP cells. New knowledge in this area should lead to new approaches, both on the understanding of tumor progression in cancer cells and on the regulatory pathways of tissue regeneration.

Introduction

Bone marrow is the host niche for different multipotent stem cells (Hernandez & Dorticós, 2004). Stem cells (SC) can self-renew and differentiate into other cell lineages, having a key role in tissue regeneration. Although usually the SC have been identified by immunophenotyping of membrane components through flow cytometry techniques, another interesting strategy is to evaluate the functional capacity according to emit more or less fluorescence when analyzed by FACS (Fluorescence-activated cell sorting). This second method is based in their capacity to expel specific cytofluorochrome molecules. *Goodell et al*, was first in distinguish by means of FACS analysis, observing a characteristic kind of "tail-side" regarding the distribution pattern, in bone marrow cells population based on their different ability to pump out Hoechst 33342 a cell-permeant nuclear counterstain that emits blue fluorescence when bound to dsDNA. This dye is often used to distinguish condensed pycnotic nuclei in apoptotic

cells and for cell-cycle studies in combination with BrdU. This separated subpopulation contain the vast majority of HSC active cells from murine bone marrow but with an enriched clonogenic capacity and long-term repopulating properties, and were described with the name of Side Population (SP) (Goodell, Brose, Paradis, Conner, & Mulligan, 1996).

It has been observed that bone marrow SP, have a high power of differentiation in both animal and human models (Dubinska-Magiera, Zaremba-Czogalla, & Rzepecki, 2013), showing regeneration activity of myotubes (Gussoni et al., 1999) and are closely linked to cell differentiation of HSC (Cavazzana-Calvo, Lagresle, André-Schmutz, & Hacein-Bey-Abina, 2004). SP remain in a quiescent state until they are activated by different mechanisms which include adding cytokines (Quaini et al., 2002) and may give rise to different types of specialized cells including non-hematopoietic tissues (Polli, 2000; Prosper & Verfaillie, 2003).

In recent years, some studies have demonstrated that SP cells exist in skeletal muscle (Bachrach et al., 2004; McKinsey, Zhang, & Olson, 2001; Mouisel, Vignaud, Hourde, Butler-Browne, & Ferry, 2010) umbilical cord blood, (Scharenberg, Harkey, & Torok-Storb, 2002), liver (Asakura & Rudnicki, 2002), lung (Asakura & Rudnicki, 2002; Welm et al., 2002), pancreas (Asakura & Rudnicki, 2002), brain (Golebiewska et al., 2013), skin (Terunuma, Jackson, Kapoor, Telford, & Vogel, 2003; Triel, Vestergaard, Bolund, Jensen, & Jensen, 2004), retina (Bhattacharya et al., 2003), dental pulp (Wang, Wei, Ling, Huang, & Gong, 2010) and mammary gland (Alvi et al., 2003; Clarke, Anderson, Howell, & Potten, 2003). This wide ubiquity points to a significant therapeutic value for regenerative medicine (Alvi et al., 2003; Barquinero, Pellicer, & Petriz, 2005; Vater, Kasten, & Stiehler, 2011; Yano et al., 2005).

One of the main characteristics of SP, is their higher resistance to drug actions due to the presence of the ABC (ATP-binding cassette) transporters, which protect the cells from differentiation and developmental changes (Balbuena et al., 2011). These membrane components play an important role in the tissues as a functional barrier, through a protective action against xenobiotics (Leslie, Deeley, & Cole, 2005), but also including tumorigenicity and chemoresistance activity (Van den Broeck, Gremeaux, Topal, & Vankelecom, 2012). For these specific characteristics ABC transporters have

called attention of researchers as a preference target of great interest to study new cancer treatments.

The efflux capacity of SP is due to two types of transporters in their membrane, which bind ATP and are members of the ABC family, these are: ABCG2/ Bcrp1 and P-glycoprotein (P-gp) (Eaker, Hawley, Ramezani, & Hawley, 2004). These transporters are responsible for the resistance and drug efflux characteristics of SP, using them as a mechanism of self-preservation (Goodell et al., 1996; Matsuzaki, Kinjo, Mulligan, & Okano, 2004; Zhou et al., 2001). In addition, the presence of the ABCG2 transporter is considered as an indicator of a primitive stem cell stage (Scharenberg et al., 2002).

ABC transporter and its relationship to hypoxia

A novel ATP-dependent efflux protein was identified in 1998, named the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) (Doyle et al., 1998). Currently it is known that the ABCG2 transcription increase under hypoxic conditions due to the binding of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) to an hypoxia response element (HRE) (P Krishnamurthy et al., 2004) thus providing an important cell survival advantage of SP under hypoxic conditions. The expression of this protein protects SP cells of porphyrin accumulation, which is a cause of mitochondrial death (Partha Krishnamurthy & Schuetz, 2005). This type of protection is increased when the amount of oxygen available for the cell decreases, while the absence of ABCG2 makes stem cells highly sensitive to changes in oxygen pressure (P Krishnamurthy et al., 2004). It is also known that ABCG2 increases its response during hypoxia exposure, which may explain that SP cells are detected at such high levels with only one 4-hour session of simulated altitude exposure (Núñez-Espinosa et al., 2014).

Under hypoxic conditions has been observed that the ABCG2 transporter plays a significant role in the hypoxia-reoxygenation kidney injury (W.-H. Liu et al., 2013), protects SP cells from oxidative stress both in the corneal epithelium (Kubota et al., 2010) as in the heart, thus accomplishing a protective functional role. As a consequence ABCG2 transporter can be considered as a direct downstream target of HIF-2 α (Martin et al., 2008). On the other hand, probably another factor implicit in this response is the ABCB1 gene. This gene is sensitive to hypoxia and is responsible for the encoding of P-

gp (Ueda et al., 1987), a finding that can be considered as an evidence of the quick response pathway under hypoxic conditions (Comerford et al., 2002).

In short, ABC transporters family, and especially ABCG2, appears to be responsible for the resistance and adaptation of SP cells to hypoxic conditions, which gives these membrane component a high interest in the study of novel cancer treatment.

Hypoxia in cancer SP

The link between stem cells and cancer hypoxia (CSC) is fairly strong. Tumor hypoxia maintains the undifferentiated state and promotes the ability of self-renewing population of stem cells (Heddleston, Li, McLendon, Hjelmeland, & Rich, 2009; Kim, Lin, Glazer, & Yun, 2009; Li & Rich, 2010) and is a common characteristic of solid tumors (Li & Rich, 2010) including breast cancer, prostate cancer, brain tumor, malignant melanomas, metastatic liver cancer and ovarian cancer cells (Higgins et al., 2009; Jensen, 2009; Selvendiran et al., 2009; Sooriakumaran & Kaba, 2005; P Vaupel, Briest, & Höckel, 2002; Peter Vaupel & Mayer, 2007). Hypoxia condition is considered as one of the most serious therapeutic problems of the cancer patient, becoming a fundamental factor in some of the events of tumor progression, including angiogenesis, infiltration and metastasis (Conley et al., 2012; Louie et al., 2010) as well as the lack of response to radiotherapy and chemotherapy (Wen et al., 2014) which increase the probability of tumor recurrence.

The study of the cancer-SP is essential. This cell group is closely related to the niche of cancer cells that have the ability to initiate and lead tumor growth under hypoxic conditions and also with the operation of the mechanism of multidrug resistance that is expressed by tumor cells.

Hypoxia is the most characteristic microenvironmental factor and potential contributor to the increase in multidrug resistance of cancer tumor (Iyer, Singh, Ganta, & Amiji, 2013). Recent studies have confirmed the importance of hypoxic condition on increasing SP (Takeuchi et al., 2010; Wang et al., 2010). It has been established that under these conditions the SC of glioblastoma can increase two-times their clonogenicity capacity, while under these same conditions SP cells can increase five-fold (Bar, Lin, Mahairaki, Matsui, & Eberhart, 2010). Furthermore, it has been observed that hypoxic stress condition of SP cells can be enriched in different cancer cell lines,

contributing to a more malignant phenotype (Tavaluc, Hart, Dicker, & El-Deiry, 2007). In ovarian cancer cells the hypoxia condition improve their stem cell properties through factors related to stem-like properties, resulting in a more aggressive growth after return to normal oxygenation (Liang et al., 2012).

All these evidences allow us to support that hypoxia is a determining factor in the conservation and progression of cancerous tumors, thus becoming a key factor in the study of SP cells under these conditions and also giving us the opportunity take new approaches to develop new therapies against this disease (Brown, 2007; Chen & Liu, 2012; Wilson & Hay, 2011).

New perspective in regeneration pathway

In bone marrow, the SP cells are present in a wide variety of tissues and is now accepted that SP may have important therapeutic value for tissue regeneration (Alvi et al., 2003; Barquinero et al., 2005; Meeson, Fuller, Breault, Owens, & Richardson, 2013; Yano et al., 2005). Nowadays the great interest in the study of the SP has allowed determining the survival times that have these cells in vivo (Michalova et al., 2011), the improvement of their appropriate culture and expansion through feeder cells (Pacak & Cowan, 2014) and the standardization of suitable protocols for the analysis of these cells by FACS (Petritz, 2013; Telford, Bradford, Godfrey, Robey, & Bates, 2007).

In addition, it has been observed that SP amniotic-mesenchymal tissue, which have been cultured in the presence of VEGF (vascular endothelial grow factor) in hypoxia, differentiate into vascular endothelial lineage as a result of up-regulation of the expression of genes associated with angiogenesis through activation of HIF pathway (Maruyama et al., 2013). This relationship between hypoxia and SP has been also studied in the repair and regeneration processes of dental pulp, where SP markedly increases after simulated ischemia (Wang et al., 2010).

One of the tissues where has been noted the importance of SP in regenerative processes is the skeletal muscle. Muscle SP, undergoes differentiation into satellite cells and can take up a position in their niche taking part actively in the process of muscle regeneration (Dubinska-Magiera et al., 2013; McKinsey et al., 2001). Apart from its obvious applicability in the recovery of sports and work injuries, this phenomenon has been also considered in the development of therapeutic strategies for dystrophic patients

because of its ability to be delivered via blood circulation, which facilitate the therapeutic approach for the repair of damaged muscles (Bachrach et al., 2004).

However, one of the questions still unresolved, is the mechanism through bone marrow SP migrate to tissues to collaborate with regenerative processes. Hypoxia appears to be an underlying factor to elicit this type of cell migration. *Liu, et al.* determined that after renal ischemia-reperfusion, it appears that the SP-liver tend to be depleted in an early state, and then progressively restore its baseline either by self-renewal as by means of an extra-renal source derived from bone marrow (H. Liu et al., 2013). Recent research has shown that rats with induced muscle damage subjected to hypoxia and exercise have a high percentage of SP the early days of hypoxic exposure and gradually decreasing in subsequent days, opposed to the SC count which increases significantly on day 7 of treatment. This different course time in the presence of the two cell types in circulating blood can be explained by a possible migration of bone marrow-SP in response to cell mobilization after muscle damage (Núñez-Espinosa et al., 2014).

Although these data offer promising perspectives for the role of SP in regenerative processes, especially when combining with hypoxic condition (by exposure to natural altitude or artificial hypoxia systems such as hypobaric chambers or normobaric hypoxia devices) more translational oriented research is needed to a better understanding of these phenomena and to refine methods before to face more ambitious studies in the clinical area.

Acknowledgments

This study was partially supported by grants DEP2010-22205-C02-01 (Plan Nacional I+D+i 2008-2011 by Spain's Ministry of Economy and Competitiveness), CP07/00098; PI08/1132 (by the Spanish Ministry of Health) and MTN20100101 (MuscleTech Network).

Conflicts of Interest

Authors declare no conflicts of interest

References

- Alvi, A. J., Clayton, H., Joshi, C., Enver, T., Ashworth, A., Vivanco, M. D., Dale, T.C., & Smalley, M. J. (2003). Functional and molecular characterisation of mammary side population cells (vol 5, pg R1, 2003). *Breast Cancer Research*, 5(1), E1–E1. doi:10.1186/bcr563
- Asakura, A., & Rudnicki, M. A. (2002). Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation. *Experimental Hematology*, 30(11), 1339–45.
- Bachrach, E., Li, S., Perez, A. L., Schienda, J., Liadaki, K., Volinski, J., Flint, A., Chamberlain, J., & Kunkel, L. M. (2004). Systemic delivery of human microdystrophin to regenerating mouse dystrophic muscle by muscle progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(10), 3581–3586. doi:10.1073/pnas.0400373101
- Balbuena, J., Pachon-Pena, G., Lopez-Torrents, G., Aran, J. M., Garcia-Godoy, L., Castresana, J. S., & Petriz, J. (2011). Abcg2 is Required to Control the Sonic Hedgehog Pathway in Side Population Stem-Like Cells. *Cytometry Part B-Clinical Cytometry*, 80B(6), 399.
- Bar, E. E., Lin, A., Mahairaki, V., Matsui, W., & Eberhart, C. G. (2010). Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres. *The American Journal of Pathology*, 177(3), 1491–502. doi:10.2353/ajpath.2010.091021
- Barquinero, J., Pellicer, M., & Petriz, J. (2005). Therapeutic applications of stem-cells. *Medicina Clinica*, 124(13), 504–511. doi:10.1157/13073565
- Bhattacharya, S., Jackson, J. D., Das, A. V., Thoreson, W. B., Kuszynski, C., James, J., Joshi, S., & Ahmad, I. (2003). Direct identification and enrichment of retinal stem cells/progenitors by Hoechst dye efflux assay. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(6), 2764–73.
- Brown, J. M. (2007). Tumor hypoxia in cancer therapy. *Methods in Enzymology*, 435, 297–321. doi:10.1016/S0076-6879(07)35015-5
- Cavazzana-Calvo, M., Lagresle, C., André-Schmutz, I., & Hacein-Bey-Abina, S. (2004). The bone marrow: a reserve of stem cells able to repair various tissues?. *Annales de Biologie Clinique*, 62(2), 131–8.
- Chen, G.-Q., & Liu, W. (2012). Anticancer Effects of Intermittent Hypoxia in Acute Myeloid Leukemia. In L. Xi & T. V Serebrovskaya (Eds.), *Intermittent Hypoxia and Human Diseases SE - 19* (pp. 229–238). Springer London. doi:10.1007/978-1-4471-2906-6_19
- Clarke, R. B., Anderson, E., Howell, A., & Potten, C. S. (2003). Regulation of human breast epithelial stem cells. *Cell Proliferation*, 36 Suppl 1, 45–58.

- Comerford, K. M., Wallace, T. J., Karhausen, J., Gene, M. D. R., Louis, N. A., Montalto, M. C., & Colgan, S. P. (2002). Hypoxia-inducible Factor-1-dependent Regulation of the Multidrug Resistance (MDR1) Gene Hypoxia-inducible Factor-1-dependent Regulation of the Multidrug Resistance. *Cancer Research*, 62(1), 3387–3394.
- Conley, S. J., Gheordunescu, E., Kakarala, P., Newman, B., Korkaya, H., Heath, A. N., Clouthier, S.G., & Wicha, M. S. (2012). Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(8), 2784–9. doi:10.1073/pnas.1018866109
- Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K., & Ross, D. D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), 15665–70.
- Dubinska-Magiera, M., Zaremba-Czogalla, M., & Rzepecki, R. (2013). Muscle development, regeneration and laminopathies: how lamins or lamina-associated proteins can contribute to muscle development, regeneration and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 70(15), 2713–41. doi:10.1007/s00018-012-1190-3
- Eaker, S. S., Hawley, T. S., Ramezani, A., & Hawley, R. G. (2004). Detection and enrichment of hematopoietic stem cells by side population phenotype. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 263, 161–80. doi:10.1385/1-59259-773-4:161
- Golebiewska, A., Bougnaud, S., Stieber, D., Brons, N. H. C., Vallar, L., Hertel, F., Klink, B., Schröck, E., Bjerkvig, R., & Niclou, S. P. (2013). Side population in human glioblastoma is non-tumorigenic and characterizes brain endothelial cells. *Brain : A Journal of Neurology*, 136(Pt 5), 1462–75. doi:10.1093/brain/awt025
- Goodell, M. A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A. S., & Mulligan, R. C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(4), 1797–806.
- Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C. D., Buzney, E. A., Khan, M. K., Flint, A. F., Kunkel, L.M., & Mulligan, R. C. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*, 401(6751), 390–4. doi:10.1038/43919
- Heddleston, J. M., Li, Z., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B., & Rich, J. N. (2009). The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(20), 3274–84.
- Hernandez, P., & Dorticós, E. (2004). Medicina regenerativa. Celulas madre embrionarias y adultas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología Y Hemoterapia*, 20(3).

- Higgins, L. H., Withers, H. G., Garbens, A., Love, H. D., Magnoni, L., Hayward, S. W., & Moyes, C. D. (2009). Hypoxia and the metabolic phenotype of prostate cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787(12), 1433–43. doi:10.1016/j.bbabi.2009.06.003
- Iyer, A. K., Singh, A., Ganta, S., & Amiji, M. M. (2013). Role of integrated cancer nanomedicine in overcoming drug resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(13-14), 1784–802. doi:10.1016/j.addr.2013.07.012
- Jensen, R. L. (2009). Brain tumor hypoxia: tumorigenesis, angiogenesis, imaging, pseudoprogression, and as a therapeutic target. *Journal of Neuro-Oncology*, 92(3), 317–35. doi:10.1007/s11060-009-9827-2
- Kim, Y., Lin, Q., Glazer, P. M., & Yun, Z. (2009). Hypoxic tumor microenvironment and cancer cell differentiation. *Current Molecular Medicine*, 9(4), 425–34.
- Krishnamurthy, P., Ross, D. D., Nakanishi, T., Bailey-Dell, K., Zhou, S., Mercer, K. E., Sarkadi, B., Sorrentino, B.P., & Schuetz, J. D. (2004). The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *Journal of Biological Chemistry*, 279(23), 24218–24225. doi:10.1074/jbc.M313599200
- Krishnamurthy, P., & Schuetz, J. D. (2005). The ABC transporter Abcg2/Bcrp: role in hypoxia mediated survival. *Biometals : An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 18(4), 349–58. doi:10.1007/s10534-005-3709-7
- Kubota, M., Shimmura, S., Miyashita, H., Kawashima, M., Kawakita, T., & Tsubota, K. (2010). The anti-oxidative role of ABCG2 in corneal epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(11), 5617–22. doi:10.1167/iops.10-5463
- Leslie, E. M., Deeley, R. G., & Cole, S. P. C. (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204(3), 216–237. doi:10.1016/j.taap.2004.10.012
- Li, Z., & Rich, J. N. (2010). Hypoxia and hypoxia inducible factors in cancer stem cell maintenance. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 345, 21–30. doi:10.1007/82_2010_75
- Liang, D., Ma, Y., Liu, J., Trope, C. G., Holm, R., Nesland, J. M., & Suo, Z. (2012). The hypoxic microenvironment upgrades stem-like properties of ovarian cancer cells. *BMC Cancer*, 12, 201. doi:10.1186/1471-2407-12-201
- Liu, H., Liu, W., Liu, S., Meng, Q., Zhang, N., Wang, H., Zhang, P., & Sun, S. (2013). Reconstitution of kidney side population cells after ischemia-reperfusion injury by self-proliferation and bone marrow-derived cell homing. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 2013, 370961. doi:10.1155/2013/370961

- Liu, W.H., Liu, H.B., Gao, D.K., Ge, G.Q., Zhang, P., Sun, S.R., Wang, H.M., & Liu, S.B. (2013). ABCG2 protects kidney side population cells from hypoxia/reoxygenation injury through activation of the MEK/ERK pathway. *Cell Transplantation*, 22(10), 1859–68. doi:10.3727/096368912X657206
- Louie, E., Nik, S., Chen, J.-S., Schmidt, M., Song, B., Pacson, C., Chen, X.F., Park, S., Ju, J., & Chen, E. I. (2010). Identification of a stem-like cell population by exposing metastatic breast cancer cell lines to repetitive cycles of hypoxia and reoxygenation. *Breast Cancer Research : BCR*, 12(6), R94. doi:10.1186/bcr2773
- Martin, C. M., Ferdous, A., Gallardo, T., Humphries, C., Sadek, H., Caprioli, A., Garcia, J.A., Szweda, L.I., Garry, M.G., & Garry, D. J. (2008). Hypoxia-inducible factor-2alpha transactivates Abcg2 and promotes cytoprotection in cardiac side population cells. *Circulation Research*, 102(9), 1075–81. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.161729
- Maruyama, N., Kokubo, K., Shinbo, T., Hirose, M., Kobayashi, M., Sakuragawa, N., & Kobayashi, H. (2013). Hypoxia enhances the induction of human amniotic mesenchymal side population cells into vascular endothelial lineage. *International Journal of Molecular Medicine*, 32(2), 315–322. doi:10.3892/ijmm.2013.1412
- Matsuzaki, Y., Kinjo, K., Mulligan, R. C., & Okano, H. (2004). Unexpectedly efficient homing capacity of purified murine hematopoietic stem cells. *Immunity*, 20(1), 87–93.
- McKinsey, T. A., Zhang, C. L., & Olson, E. N. (2001). Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Current Opinion in Genetics & Development*, 11(5), 497–504. doi:10.1016/S0959-437X(00)00224-0
- Meeson, A., Fuller, A., Breault, D. T., Owens, W. A., & Richardson, G. D. (2013). Optimised Protocols for the Identification of the Murine Cardiac Side Population. *Stem Cell Reviews and Reports*, 9(5), 731–739. doi:10.1007/s12015-013-9440-9
- Michalova, J., Savvulidi, F., Sefc, L., Faltusova, K., Forgacova, K., & Necas, E. (2011). Hematopoietic stem cells survive circulation arrest and reconstitute hematopoiesis in myeloablated mice. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 17(9), 1273–81. doi:10.1016/j.bbmt.2011.07.007
- Mouisel, E., Vignaud, A., Hourde, C., Butler-Browne, G., & Ferry, A. (2010). Muscle Weakness and Atrophy are Associated with Decreased Regenerative Capacity and Changes in Mtor Signaling in Skeletal Muscles of Venerable (18-24-Month-Old) Dystrophic Mdx Mice. *Muscle & Nerve*, 41(6), 809–818. doi:10.1002/mus.21624
- Núñez-Espinosa, C., Ferreira, I., Ríos-Kristjánsson, J. G., Rizo-Roca, D., Godoy, M. D. G., Rico, L. G., Rubi-Sans, G., Torrella, J.R., Pagès, T., Petriz, J., & Viscor, G. (2014). Effects of Intermittent Hypoxia and Light Aerobic Exercise on Circulating Stem Cells and Side Population, After Strenuous Eccentric Exercise in Trained Rats. *Current Stem Cell Research & Therapy*.

- Pacak, C. A., & Cowan, D. B. (2014). Growth of bone marrow and skeletal muscle side population stem cells in suspension culture. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1210, 51–61. doi:10.1007/978-1-4939-1435-7_5
- Petriz, J. (2013). Flow cytometry of the side population (SP). *Current Protocols in Cytometry / Editorial Board, J.Paul Robinson, Managing Editor ...[et Al.]*, Chapter 9, Unit9.23–Unit9.23.
- Polli, E. E. (2000). Transplanting bone-marrow stem cells in the central nervous system. *Haematologica*, 85(10), 1009–10.
- Prosper, F., & Verfaillie, C. (2003). Celulas madres adultas. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, 26, 345–56.
- Quaini, F., Urbanek, K., Beltrami, A. P., Finato, N., Beltrami, C. A., Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Leri, A., & Anversa, P. (2002). Chimerism of the transplanted heart. *The New England Journal of Medicine*, 346(1), 5–15. doi:10.1056/NEJMoa012081
- Scharenberg, C. W., Harkey, M. A., & Torok-Storb, B. (2002). The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood*, 99(2), 507–512. doi:10.1182/blood.V99.2.507
- Selvendiran, K., Bratasz, A., Kuppusamy, M. L., Tazi, M. F., Rivera, B. K., & Kuppusamy, P. (2009). Hypoxia induces chemoresistance in ovarian cancer cells by activation of signal transducer and activator of transcription 3. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 125(9), 2198–204. doi:10.1002/ijc.24601
- Sooriakumaran, P., & Kaba, R. (2005). Angiogenesis and the tumour hypoxia response in prostate cancer: a review. *International Journal of Surgery (London, England)*, 3(1), 61–7. doi:10.1016/j.ijso.2005.03.013
- Takeuchi, M., Kimura, S., Kuroda, J., Ashihara, E., Kawatani, M., Osada, H., Umezawa, K., Yasui, E., Imoto, M., Tsuruo, T., Yokota, A., Nagao, R., Nakahata, T., Fujiyama, Y., & Maekawa, T. (2010). Glyoxalase-I is a novel target against Bcr-Abl+ leukemic cells acquiring stem-like characteristics in a hypoxic environment. *Cell Death and Differentiation*, 17(7), 1211–20. doi:10.1038/cdd.2010.6
- Tavaluc, R. T., Hart, L. S., Dicker, D. T., & El-Deiry, W. S. (2007). Effects of low confluency, serum starvation and hypoxia on the side population of cancer cell lines. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 6(20), 2554–62.
- Telford, W. G., Bradford, J., Godfrey, W., Robey, R. W., & Bates, S. E. (2007). Side population analysis using a violet-excited cell-permeable DNA binding dye. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 25(4), 1029–36. doi:10.1634/stemcells.2006-0567
- Terunuma, A., Jackson, K. L., Kapoor, V., Telford, W. G., & Vogel, J. C. (2003). Side population keratinocytes resembling bone marrow side population stem cells are

- distinct from label-retaining keratinocyte stem cells. *The Journal of Investigative Dermatology*, 121(5), 1095–103. doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12531.x
- Triel, C., Vestergaard, M. E., Bolund, L., Jensen, T. G., & Jensen, U. B. (2004). Side population cells in human and mouse epidermis lack stem cell characteristics. *Experimental Cell Research*, 295(1), 79–90. doi:10.1016/j.yexcr.2003.11.032
- Ueda, K., Clark, D. P., Chen, C. J., Roninson, I. B., Gottesman, M. M., & Pastan, I. (1987). The human multidrug resistance (mdr1) gene. cDNA cloning and transcription initiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(2), 505–8.
- Van den Broeck, A., Gremeaux, L., Topal, B., & Vankelecom, H. (2012). Human pancreatic adenocarcinoma contains a side population resistant to gemcitabine. *BMC Cancer*, 12, 354. doi:10.1186/1471-2407-12-354
- Vater, C., Kasten, P., & Stiehler, M. (2011). Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomaterialia*, 7(2), 463–77. doi:10.1016/j.actbio.2010.07.037
- Vaupel, P., Briest, S., & Höckel, M. (2002). Hypoxia in breast cancer: pathogenesis, characterization and biological/therapeutic implications. *Wiener Medizinische Wochenschrift (1946)*, 152(13-14), 334–42.
- Vaupel, P., & Mayer, A. (2007). Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Reviews*, 26(2), 225–39. doi:10.1007/s10555-007-9055-1
- Wang, J., Wei, X., Ling, J., Huang, Y., & Gong, Q. (2010). Side population increase after simulated transient ischemia in human dental pulp cell. *Journal of Endodontics*, 36(3), 453–8. doi:10.1016/j.joen.2009.11.018
- Welm, B. E., Tepera, S. B., Venezia, T., Graubert, T. A., Rosen, J. M., & Goodell, M. A. (2002). Sca-1(pos) cells in the mouse mammary gland represent an enriched progenitor cell population. *Developmental Biology*, 245(1), 42–56. doi:10.1006/dbio.2002.0625
- Wen, J., Tao, W., Kuitse, I., Lin, P., Feng, Y., Jones, R. J., Orlowski, R.Z., & Zu, Y. (2014). Dynamic balance of multiple myeloma clonogenic side population cell percentages controlled by environmental conditions. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*. doi:10.1002/ijc.29078
- Wilson, W. R., & Hay, M. P. (2011). Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*, 11(6), 393–410. doi:10.1038/nrc3064
- Yano, S., Ito, Y., Fujimoto, M., Hamazaki, T. S., Tamaki, K., & Okochi, H. (2005). Characterization and localization of side population cells in mouse skin. *Stem Cells*, 23(6), 834–841. doi:10.1634/stemcells.2004-0226
- Zhou, S., Schuetz, J. D., Bunting, K. D., Colapietro, A. M., Sampath, J., Morris, J. J., Lagutina, I., Grosveld, G.C., Osawa, M., Nakauchi, H., & Sorrentino, B. P. (2001).

The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nature Medicine*, 7(9), 1028–34. doi:10.1038/nm0901-1028

8. ANEXOS

ANEXO I

Proceso de muestreo proyecto “Efecto de la hipoxia hipobárica intermitente en la recuperación del daño muscular inducido en ratas de laboratorio”

Flow Sheet of the Sampling Process S33+ Sampling 33+

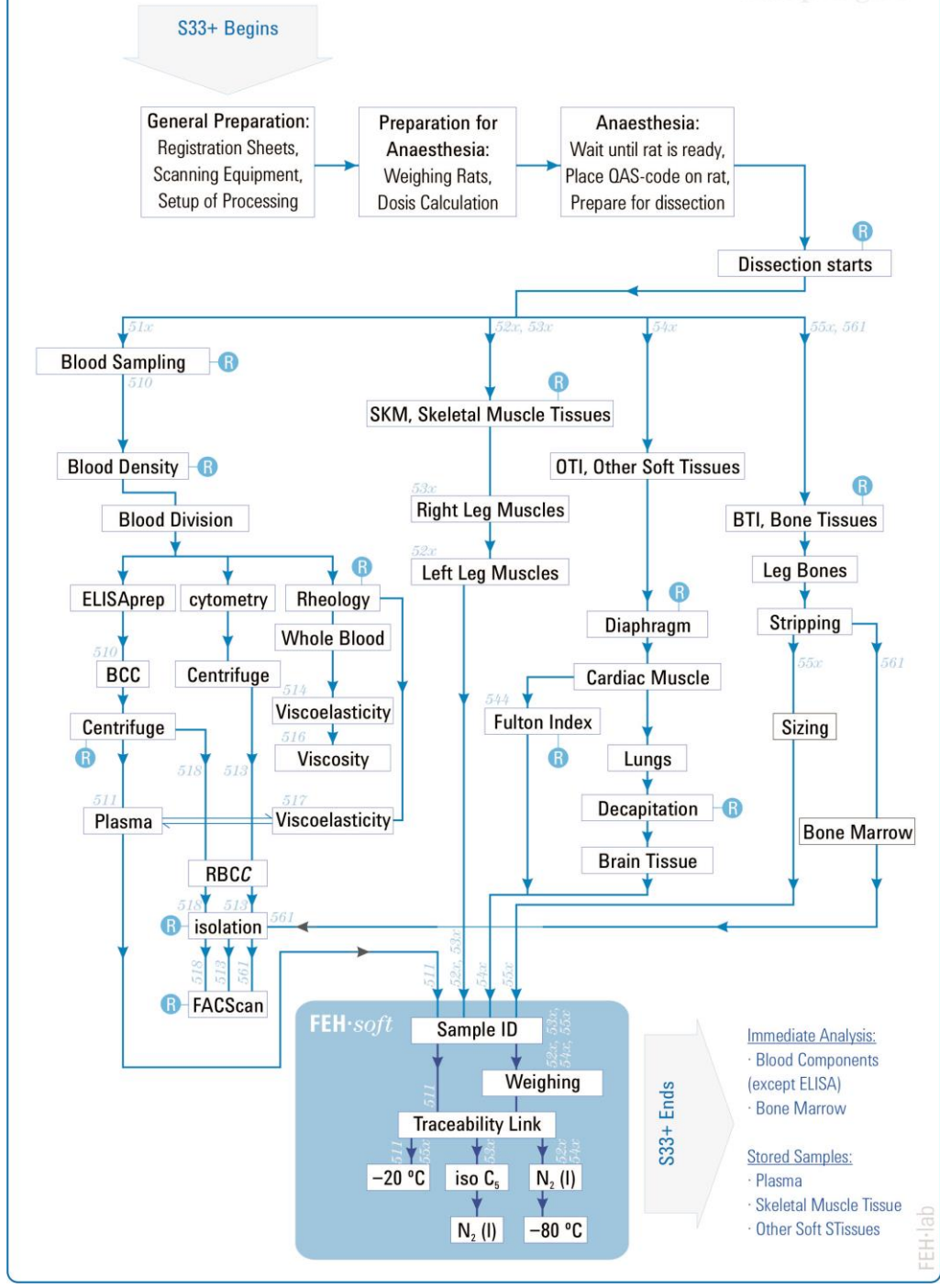


Figura 13. Flow Sheet of Sampling Process S33+ (FEH-lab, 2014)

ANEXO II

Diseño experimental

Animales de laboratorio

Los animales experimentales utilizados en este estudio fueron un total de 64 ratas Sprague Dawley, con un peso en un rango de 350 a 410 gramos. Cada una de las ratas fue aleatoriamente asignada, de forma previa, tanto a las diferentes condiciones experimentales como a un tiempo de muestreo específico. Todos los análisis se llevaron a cabo a través de un sistema de doble ciego por medio de la identificación por código de barras, que fue implementado desde que el animal ingresa en el laboratorio.

Los animales fueron separados en los siguientes grupos experimentales: Grupo Untrained (UNT), que no fue sometido a ninguna intervención o formación y fue conformado por las ratas que se rechazan a correr en la cinta; Grupo Trainer (TRA), grupo de ratas que fueron entrenadas, pero no sufrieron daño muscular antes del muestreo. Ambos grupos fueron diferenciados dentro de la clasificación del diseño experimental como controles negativos (neg).

Luego del protocolo de daño muscular otros tres grupos se conformaron: Grupo Control (CTRL), que fueron ratas entrenadas que sufrieron una lesión muscular, pero no tuvieron otra intervención (recuperación pasiva), las cuales según el diseño experimental conforman el grupo de control positivo (pos); Hypoxia Intermittent Group (HYP), que fueron ratas entrenadas, expuestas a sesiones de hipoxia hipobárica intermitente después del protocolo de daño muscular; Exercise and Intermittent Hypoxia Group (EHYP), que fueron ratas entrenadas, que luego del procedimiento de daño muscular, fueron sometidas a sesiones intermitente de hipoxia hipobárica, además de la aplicación de un programa de ejercicios de rehabilitación constituido por sesiones ligeras de ejercicio aeróbico.

Los animales de los grupos UNT y TRA fueron eutanasiados justo un día antes de la lesión muscular de sus pares (t00). El resto de los grupos experimentales, fueron muestreados según la programación del diseño experimental para los días uno (t01), tres (t03), siete (t07) o catorce (t14) después de un daño muscular.

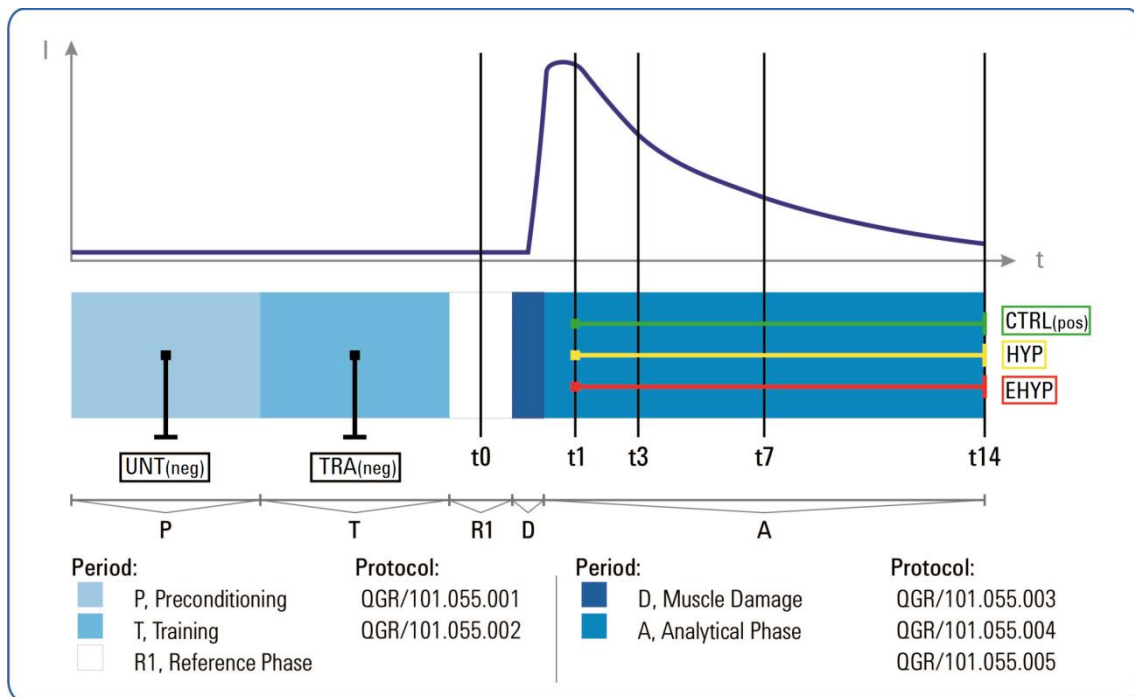


Figura 14. Diseño experimental del estudio. La primera fase de pre-acondicionamiento (P) tarda diez días; la fase de entrenamiento (T) tarda diez días más; R1, es la fase de referencia, la cual se refiere a un día de descanso; D, es el día en que el daño muscular es inducido. Luego está la fase de análisis (A) que se divide en t01, t03, t07 y t14, entendiéndose que t00 corresponde al día antes de que el daño, aplicable solo al grupo TRA. En relación a los demás días t01 corresponde al día después de los daños; t03 es tres días después del daño; t14 es catorce días después del daño. La curva es representativa de los marcadores de daño detectada por ELISA, que tiene un pico en t01 y disminuye hasta t014.(FEH-lab, 2014)

Cabe señalar que para la confección del artículo 1 se utilizaron las 64 muestras de animales y la totalidad de grupos experimentales, mientras que para el artículo 2 se utilizó una muestra de 52 animales de los grupos UNT, CTRL, HYP, EHYP, teniendo cada grupo un promedio de 4 ratas.

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con los protocolos internos de nuestro laboratorio, que fueron autorizados por el Comité Ético de la Universidad de Barcelona para Experimentación Animal y ratificado, de acuerdo con el actual La legislación española, por el Departament de Medi Ambient i Habitatge (archivo # 1899) del Gobierno catalán (Generalitat de Catalunya).

Condiciones de estabulario

Los animales fueron mantenidos en el estabulario de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona durante un periodo mínimo de siete días, debido a la obligada cuarentena a la cual deben ser sometidos. Transcurrido este tiempo los animales fueron trasladados al Departamento de Fisiología e Inmunología de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, en donde tuvo lugar el proceso de aclimatación, entrenamiento y muestreo de cada uno de estos animales.

Todos los animales fueron recibidos del estabulario en jaulas, junto con el suministro de viruta (ropa de cama) y comida (pienso comercial) que se necesita para su mantención. Una vez llegado al departamento fueron etiquetados y ubicados en jaulas de no más de tres individuos por cada una de ellas. Cada jaula tenía las medidas recomendadas de ancho (27 cm), longitud (50 cm) y altura (14 cm), para asegurar el bienestar animal (Zúñiga *et al.*, 2001).



Figura 15. Condiciones de estabulario en FEH-lab, Universidad de Barcelona.

Las ratas fueron mantenidas a una temperatura estable de 23 °C y una humedad relativa entre un 40% a 60%, asegurándose así, las condiciones óptimas para el bienestar animal durante todo el tiempo del experimento.

Los animales estuvieron expuestos a ciclos de luz- oscuridad de 12h/12h, con comida y agua “ad libitum”, incluso durante las sesiones de hipoxia (cuatro horas diarias)

Diariamente los animales fueron examinados para detectar posibles heridas o cambios de comportamientos, así como también se practicaba handling (manipulación) bajo el protocolo nº 101.065.005 (anexo 1). Además se siguieron estrictos controles de la ingesta de alimento y agua, como también de la calidad de sus heces, pelaje, uñas y dientes en cada uno de ellos. Tres veces por semana era necesario añadir alimento a todas las ratas, cambiar el agua y la viruta de la jaula. Una vez a la semana se limpiaban las jaulas con jabón y alcohol.

Protocolo de Entrenamiento

Los animales pertenecientes a los grupos experimentales TRA, CTRL, HYP y EHYP fueron entrenados en condiciones ambientales normales (presión barométrica nivel del mar y $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura ambiente) en una cinta de entrenamiento (LE 8710, Panlab, Barcelona, España), la cual cuenta con cinco cubículos permitiendo entrenar a cinco ratas de manera simultánea. La cinta en entrenamiento cuenta con un tablero que proporciona pequeños choques eléctricos que hace que las ratas corran. Los parámetros medidos por la cinta son el número de choques, la distancia recorrida y el tiempo total de descarga. La velocidad de la cinta y la intensidad de corriente también pudieron ser controladas para ajustarse al protocolo.



Figura 16. Protocolo de entrenamiento en cinta LE 8710.

Las sesiones de entrenamiento fueron precedidas por un período de diez días de pre-acondicionamiento. Los primeros 4 días del pre-acondicionamiento tuvieron sólo una sesión por la mañana (sesión A) y el resto de los días dos sesiones una en la mañana y otra en la tarde (sesión B), las cuales debían tener 6 horas de descanso como mínimo, entre el final del período de sesiones A y el comienzo de la sesión B. Durante este periodo de pre-acondicionamiento tanto la intensidad de la corriente (puede variar de 0,2 mA a 1 mA), como la velocidad de la cinta (de 0cm.s⁻¹ a 40cm.s⁻¹) y el tiempo de funcionamiento de esta (de 10 min a 43 min) fueron cambiando a lo largo de todo este periodo.

El período de entrenamiento consistió en dos sesiones diarias de carrera durante las dos semanas siguientes, especificado en el protocolo nº 101.055.002 (anexo 3). En cada sesión de entrenamiento de 35 min se establecía un periodo de aceleración de 5 min (25cm·s⁻¹ a 45cm·s⁻¹) y un periodo estable de 30 minutos (45cm·s⁻¹). El periodo de entrenamiento se llevó a cabo dos veces al día, la sesión A en las mañanas y las sesiones B en las tardes, considerando un periodo mínimo de descanso entre ambas sesiones de 6 h. Todas las ratas de los grupos experimentales mencionados anteriormente, exceptuando UNT, llevaron a cabo este protocolo de entrenamiento antes de la sesión de daño muscular. En ambas fases, un período de recuperación de al menos 6 horas de descanso estaba previsto entre el final del primer período de sesiones y el comienzo de la segunda sesión en el mismo día.

Protocolo de daño muscular

Posterior al periodo de entrenamiento, se dio paso a la fase de daño muscular. Antes de comenzar el protocolo, cada rata fue pesada y evaluada, así como también la temperatura y la humedad relativa en el ambiente.

El daño muscular esquelético fue inducido por medio de ejercicio excéntrico (Armstrong *et al.*, 1983). Cada animal debió correr cuesta abajo a $50 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ y con una pendiente de 15° de declinación hasta el agotamiento. Este protocolo se inició después de tres días de reposo, luego de la finalización del periodo de entrenamiento, y se aplicó dos veces durante el mismo día: una sesión por la mañana y otra por la tarde, con un descanso mínimo de 4 h entre el final de la primera sesión y el comienzo de la segunda.



Figura 17. Protocolo de daño muscular fisiológico inducido en ratas en cinta de entrenamiento LE 8710.

La duración de la sesión de daño muscular dependía de las características individuales de cada rata. Cuando la rata no podía continuar corriendo por la lesión muscular era retirada de la cinta de entrenamiento de forma inmediata. Esta decisión era basada en el protocolo de estilo de carrera (anexo V), el cual establece claramente los distintos estilos de carrera que muestran los animales durante el procedimiento.

Exposición a Hipoxia Hipobárica Intermitente

Sesiones de hipoxia hipobárica intermitentes se realizaron en una cámara hipobárica con un volumen de aproximadamente 450 L (65 x 90 x 80 cm), que proporciona un amplio espacio para tres jaulas de ratas. Las paredes de la cámara eran de polimetacrilato de metilo, que es transparente y permite la observación permanente de los animales durante el protocolo de exposición. Un vacío relativo fue creado usando una bomba de vacío de rotación (TRIVAC D5E, Leybold, Köln, Alemania) y mediante la regulación de la tasa de flujo de aire en la entrada de una válvula micrométrica. La presión interior de la cámara fue controlado por dos sensores de presión diferencial (ID 2000, Leybold, Köln, Alemania) y la conducción de un regulador de presión de diafragma (MR16, Leybold, Köln, Alemania). El protocolo de exposición hipóxica está especificado en el documento n° 101.055.004 (anexo 7), en el cual queda claramente establecido que la presión objetivo era 462 Torr (equivalente a 4000 m.s.n.m.), la cual debe ser alcanzada de forma gradual, disminuyendo la presión dentro de la cámara hipobárica durante aproximadamente 15 min. Una vez que se había alcanzado esta presión dentro de la cámara, se mantuvo su regulación durante 4 h. Al final de la sesión, la presurización se logró progresivamente en 15 min.



Figura 18. Protocolo experimental de exposición a hipoxia hipobárica de ratas.

Sólo los animales pertenecientes al grupo HYP y EHYP fueron sometidos a este procedimiento y solamente durante las mañanas. Los días totales de exposición hipoxia hipobárica variaron de acuerdo al cronograma de muestreo. Animales asignados a "t01" fueron expuestos solo a una sesión, mientras que "t14" fueron expuestos a dos semanas de exposición diaria. Los animales tuvieron acceso ad libitum a alimento y agua durante las sesiones, ya que fueron mantenidos en depósitos al aire libre durante las sesiones de hipoxia dentro de la cámara hipobárica.

Programa de ejercicio de rehabilitación

Las ratas en el grupo de EHYP se sometieron a un programa de ejercicios de rehabilitación inmediatamente después de la sesión de hipoxia hipobárica. La sesión diaria de ejercicio aeróbico ligero consistía en ubicar a las ratas en una cinta rodante programada para realizar un ejercicio muscular concéntrico de bajo impacto.

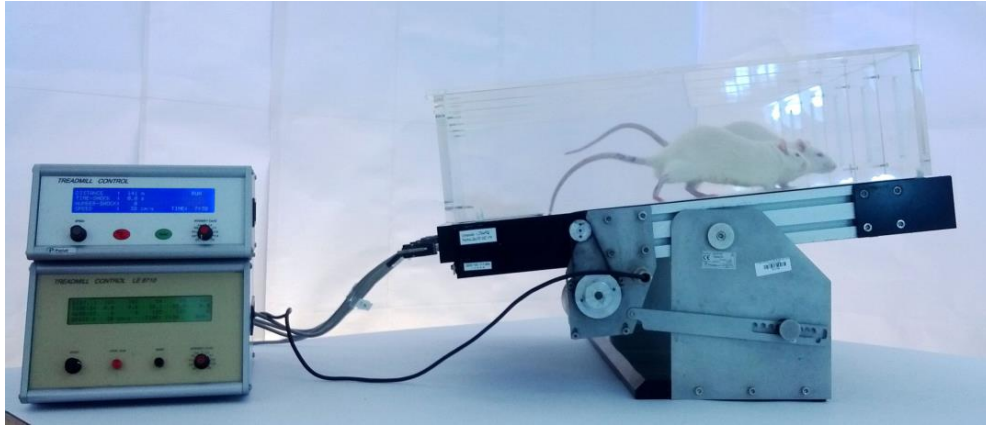


Figura 19. Protocolo de ejercicio de rehabilitación en cinta de entrenamiento LE 8710.

La sesión de entrenamiento duraba 20 minutos y consistía en una fase de 1 min sin velocidad ni inclinación, seguido de 5 min de correr, comenzando con una velocidad de $10 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ hasta alcanzar una velocidad de $30 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ con una inclinación de 5° . Una vez alcanzada estas condiciones se mantenía la velocidad y la inclinación alcanzada durante 15 min más, para posteriormente finalizar con 1 minuto de reposo y sin ninguna inclinación.

ANEXO III

Análisis hemorreológico

Procesamiento de Plasma y Sangre

Antes de la recolección de sangre, las ratas fueron anestesiadas con uretano solución ($30 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1}$) a una dosis de $5 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}$. Después de la laparotomía, una muestra de sangre de 5 ml se obtuvo por punción de la vena cava. La muestra se dividió en tres fracciones, la primera porción se separó en un tubo de heparina de sodio para el análisis hemorreológico, la segunda parte se almacenó en un tubo de EDTA, para ser utilizada en el recuento de sangre y la tercera parte también se almacenó en un tubo de EDTA (ácido etildiaminotetraacético) para ser inmediatamente preparada para el análisis de citometría de flujo. Ambas muestras alicuotadas fueron procesadas inmediatamente después de la recolección. El plasma se obtuvo por centrifugación de la sangre y se midió inmediatamente su viscosidad.

Parámetros viscoelásticos y reológicos

La Viscoelasticidad de la sangre fue medida usando un reómetro BioProfiler (Vilastic Scientific, Inc., Austin, TX, EE.UU.) con un tubo de medición de acero inoxidable de 1 mm a una temperatura constante de $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Las mediciones se obtienen a una frecuencia de 2 Hz en un intervalo de 0,2 a 100 s^{-1} de velocidad de cizallamiento (γ).



Figura 19. Reómetro BioProfi

La viscosidad, elasticidad y tiempo de relajación se tabularon a velocidades de cizallamiento de $2,6 \text{ s}^{-1}$, $12,3 \text{ s}^{-1}$ y $45,5 \text{ s}^{-1}$ correspondientes a una deformación de corte de 0,2, 1 y 4 como valores representativos de las condiciones circulatorias fisiológicas. Estos tres estados de deformación corresponden a la agregación efectos, la transición y los efectos de deformabilidad, respectivamente (Thurston, 1989, 1990).

Debido al comportamiento Newtoniano bien conocido del plasma, su viscosidad (η_{plasma}) sólo se midió a 450 s^{-1} en un microviscosímetro cono-placa (Brookfield digital reómetro Modelo DV-III +, Middleborough, MA, EE.UU.) equipado con un husillo CP40 ($0,8^\circ$) conectado a un baño externo a $37,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

El volumen de la muestra utilizada para ambos análisis fue de 0,5 ml.

ANEXO IV

Análisis por citometría de flujo

Citometría de flujo

Todos los protocolos de citometría de flujo fueron llevados a cabo en Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), en la Unidad de Investigación Biomédica y Oncología Traslacional. Los análisis fueron realizados en *Attune® Acoustic Focusing Cytometer* (Life Technologies).

Para llevar a cabo el análisis de *Stem Cell* (SC) en sangre periférica por citometría de flujo se utilizó sangre sin lisar tiñéndola simultáneamente con PE-CD34, FITC-CD45, y DCV. La combinación de filtros usados para este análisis fue 555 DLP (*Dichroic Long Pass*), BP (*Band Pass*) 530/30 (FITC), y 620 DLP, 574/26 (PE). La adquisición fue detenida cuando un mínimo de 300 células CD34+ fueron recolectadas.

Las fluorescencias FITC (Fluorescein IsoTioCyanate), PE (R-Phycoerythrin) y DCV (*Vybrant DyeCycle Violet*) fueron recogidas y analizadas en una escala logarítmica.

En el caso de las medidas de *Side Population* (SP) basadas en DCV, la combinación de filtros consistió en BP 450/40 (azul), BP 603/48 (rojo) y 500 de filtro DLP. Las fluorescencias DCV-Azul y DCV-Rojo fueron observadas en una escala lineal y en el caso del Yoduro de propidio en una escala logarítmica.

Inmunofenotipificación en citometría de flujo

La sangre anticoagulada analizada contenía 5×10^5 células ($\approx 50 \mu\text{L}$). Estas fueron incubadas en presencia de los anticuerpos PE-CD34 y FITC-CD45, como es recomendado por los protocolos de la empresa de citometría. El DCV, fue añadido después de 15 minutos de incubación a una concentración final de $10 \mu\text{M}$. Luego de 5 minutos, la sangre fue diluida usando Attune 1x focusing fluid (1/8 v/v), previo a la adquisición.

Análisis de Side Population

Las células Side Population (SP) fueron procesadas siguiendo protocolos previamente descritos (Petritz, 2013). Las células de la médula ósea fueron obtenidas del fémur de las ratas a través de “flushing” con Hank's Balanced Salt Solution (HBSS).



Figura 20. Técnica de “flushing” para obtención de células de médula ósea

El rendimiento celular de la médula ósea se determinó bajo el microscopio utilizando un hemocitómetro. El protocolo original que utiliza la tinción Hoechst, describe el uso de esta tinción para identificar y purificar células madre hematopoyéticas murinas. Alternativamente, cuando las células se cargan con DCV y se analizaron en un flujo de diodo láser violeta equipado citómetro, se observa una población lateral similar a la tradicional HO342 SP.

El DCV fue añadido a una concentración de 10 μM e incubado por 90 minutos en un baño de agua a 37 °C, con una agitación periódica (cada 5 minutos). Luego las células fueron centrifugadas por 6 minutos a 483 x g, 4°C y resuspendidas a una concentración de $1-2 \cdot 10^7$ células·ml⁻¹ en HBSS frío que contenía 2% de FBS (Fetal Bovine Serum) y 10 mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid). Las muestras fueron mantenidas a 4°C hasta el análisis. El yoduro de propidio (PI), fue añadido a una concentración de 5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ para excluir las células muertas. Con el objetivo de remover agregados celulares, las células fueron filtradas a través de una malla de nylon de 50- μm antes del análisis.

