

EFFECTOS Y ADAPTACIONES DEL ENTRENAMIENTO DE FUERZA DE BAJA INTENSIDAD EN COMBINACIÓN CON LA TÉCNICA BLOOD FLOW RESTRICTION EN ESCALADORES SANOS

**DOBLE GRADO: CIENCIAS DE LA ACTIVIDAD
FÍSICA Y EL DEPORTE + FISIOTERAPIA**

**FACULTAD CIENCIAS DE LA ACTIVIDAD
FÍSICA Y EL DEPORTE**



Realizado por: Salvador Gómez Serna

Grupo TFG: Mix 61

Año Académico: 2021-2022

Tutor/a: Susana Moral González

Área: Diseño de un estudio experimental

RESUMEN

El entrenamiento de fuerza de baja intensidad con aplicación de restricción vascular ha demostrado generar aumentos en la fuerza y la hipertrofia similares a los obtenidos con el entrenamiento tradicional de alta intensidad. Esto supone una alternativa interesante para individuos con lesiones musculoesqueléticas y/o que han sido sometidos a intervenciones quirúrgicas para reducir los tiempos de recuperación. Los escaladores, cuya lesión más frecuente es la lesión de poleas podrían ser beneficiados de esta técnica, pero existe poca información sobre su aplicación en estos sujetos. El presente estudio busca conocer las diferencias entre los efectos y adaptaciones que se desarrollan tras un protocolo de bajas cargas (30% de la contracción máxima voluntaria) entre dos grupos, uno que presenta restricción vascular durante los 20 minutos de ejercicio (al 80% de la presión de oclusión arterial) y otro que no es sometido a esta presión. La intervención consta de tres entrenamientos semanales en el transcurso de 4 semanas. Las valoraciones se centrarán en la máxima contracción voluntaria de la flexión isométrica de los dedos de la mano, la circunferencia del antebrazo y la concentración de factores angiogénicos en sangre (VEGF, HIF-1 α e iNOS).

ABSTRACT

Low-intensity resistance training with application of vascular restriction has been shown to generate increases in strength and hypertrophy similar to those obtained with traditional high-intensity training. This represents an interesting alternative for individuals with musculoskeletal injuries and/or who have undergone surgery to reduce recovery times. Climbers, whose most frequent injury is pulley injury, could benefit from this technique, but there is little information on its application in these subjects. The present study seeks to know the differences between the effects and adaptations that develop after a low-load protocol (30% of the maximum voluntary contraction) between two groups, one that presents vascular restriction during the 20 minutes of exercise (at 80% of arterial occlusion pressure) and another that is not subjected to this pressure. The intervention consists of three weekly training sessions over the course of 4 weeks. The assessments will focus on the maximum voluntary contraction of the isometric flexion of the fingers of the hand, the forearm circumference and the concentration of angiogenic factors in blood (VEGF, HIF-1 α and iNOS).

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
BFR	Blood Flow restriction
BI	Entrenamiento de fuerza de baja intensidad sin aplicación de BFR
BI.BFR	Entrenamiento de fuerza de baja intensidad con aplicación de BFR
cm	Centímetros
CPK	Creatina fosfoquinasa
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
FPD	Flexor profundo de los dedos
FSD	Flexor superficial de los dedos
HIF-1α	Factor 1 α inducible por hipoxia
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
kg	Kilogramos
LP	Perióxido lipídico
mARN	Ácido ribonucleico mensajero
MCV	Máxima contracción voluntaria
mmHg	Milímetros de mercurio
nNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
p38MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos p38
PCG-1α	Coactivador del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas
pg/mL	Picogramos por mililitro
RM	Repetición máxima
RPE	Rango de percepción del esfuerzo
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

VEGFR-2

Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular

ÍNDICE

1.	Introducción	9
1.1.	Blood Flow Restriction	9
1.1.1.	Origen y denominaciones	9
1.1.2.	Técnica	9
1.1.3.	Alternativa al entrenamiento de fuerza con altas cargas	9
1.1.4.	Adaptaciones y efectos	10
1.1.4.1.	Entrenamiento de fuerza de baja intensidad sin BFR	11
1.1.4.2.	Entrenamiento de fuerza de baja intensidad con BFR	11
1.1.4.3.	Entrenamiento de fuerza de alta intensidad con BFR	13
1.1.4.4.	Entrenamiento aeróbico con BFR	13
1.1.4.5.	Aplicación de BFR sin activación muscular	13
1.1.5.	Mecanismos involucrados en las adaptaciones y efectos de la estrategia BFR en el entrenamiento de baja intensidad	14
1.1.6.	Inclusión en planes de readaptación	15
1.2.	La escalada	17
1.2.1.	Descripción	17
1.2.2.	Tipos	18
1.2.3.	Tipos de agarres	18
1.3.	Lesión de rotura de poleas de los dedos de las manos en escaladores	20
1.3.1.	Anatomía estructural y funcional de los dedos de las manos	20
1.3.2.	Fisiopatología	23
1.3.3.	Incidencia y patogenia	24
1.3.4.	Diagnóstico	26
2.	Justificación	28
3.	Objetivos e hipótesis	29
3.1.	Objetivo principal	29
3.2.	Objetivos secundarios	29
3.3.	Hipótesis principal	29
3.4.	Hipótesis secundarias	29
4.	Metodología	31
4.1.	Diseño	31
4.2.	Muestra y formación de grupos	32

4.2.1.	Elección de la muestra.....	32
4.2.2.	Criterios de inclusión.....	33
4.2.3.	Criterios de exclusión.....	33
4.2.4.	Criterios de eliminación.....	33
4.2.5.	Muestreo.....	33
4.2.6.	Formación de los grupos.....	34
4.3.	Variables y material de medida.....	35
4.3.1.	Variables independientes.....	35
4.3.2.	Variables dependientes.....	36
4.3.3.	Variables intervinientes.....	37
4.4.	Procedimientos.....	37
4.5.	Análisis de datos.....	42
5.	Equipo investigador.....	44
6.	Viabilidad y limitaciones del estudio.....	45
6.1.	Viabilidad del estudio.....	45
6.2.	Limitaciones del estudio.....	45
7.	Referencias bibliográficas.....	48
8.	Anexos.....	56
8.1.	Anexo 1.....	56
8.2.	Anexo 2.....	58
8.3.	Anexo 3.....	60
8.4.	Anexo 4.....	65
8.5.	Anexo 5.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	16
Figura 2	18
Figura 3	19
Figura 4	20
Figura 5	21
Figura 6	22
Figura 7	23

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I	24
Tabla II	25
Tabla III	27
Tabla IV	42
Tabla V	44

1. Introducción

1.1. Blood Flow Restriction

1.1.1. Origen y denominaciones

La idea de combinar el entrenamiento de fuerza y la restricción vascular surge en Japón sobre la década de 1970 y adquiere popularidad en este país durante la siguiente, de la mano de Yoshiaki Sato, bajo el nombre de Kaatsu Training (Manini y Clark, 2009). En la literatura podremos encontrar este método de entrenamiento bajo diversos nombres, como “occlusion training” (Credeur et al., 2010), “blood flow restricted training” (Martín-Hernández et al., 2013), “blood flow occlusion” (Hammer et al., 2020) o como nos referiremos a lo largo del presente documento, “blood flow restriction” (BFR) (Jessee et al., 2018), entre otros.

1.1.2. Técnica

La técnica BFR consiste en la aplicación de una presión externa en la zona proximal de las extremidades superiores o inferiores, con la finalidad de restringir el flujo sanguíneo de éstas, mediante el uso más común de torniquetes, manguitos presurizados o bandas elásticas (Pearson y Hussain, 2014). La presión externa ejercida debe ser lo suficientemente alta como para ocluir el retorno venoso de la extremidad, pero lo suficientemente alta como para permitir el flujo arterial hacia la misma (Loenneke et al., 2014).

Encontramos evidencia sobre la utilización del método BFR en diversos contextos, diferenciando éstos en función del ejercicio físico que el sujeto desarrolla durante su aplicación, y en los cuáles se profundizará en el transcurso del presente trabajo.

1.1.3. Alternativa al entrenamiento de fuerza con altas cargas

Los individuos que desarrollan lesiones musculoesqueléticas y/o requieren ser intervenidos quirúrgicamente presentan tendencia, debido a esta condición, a

disminuir su capacidad neuromuscular, presentar dolor y perder masa muscular. Estas situaciones conllevan la disminución de la funcionalidad, la reducción de su calidad de vida y el aumento del riesgo de recidiva (Bielitzki et al., 2021). Es por ello que, los procesos de readaptación tienen el objetivo principal de recuperar la funcionalidad que los individuos presentaban antes de la lesión y/o la intervención quirúrgica, disminuyendo el riesgo de que la lesión se vuelva a producir (Hughes et al., 2018).

Teniendo en cuenta el desarrollo de la fuerza y la hipertrofia como objetivos necesarios dentro de un plan de readaptación para prevenir y mejorar episodios de atrofia muscular y disfuncionalidad, nos orientamos por las recomendaciones del American College of Sports Medicine (ACSM, 2009). Dichas recomendaciones orientan el trabajo con cargas a partir del 60-70% de 1 repetición máxima (RM) para generar adaptaciones tanto en la fuerza como en la hipertrofia muscular. Sin embargo, debemos tener en cuenta que en las fases iniciales de un programa de readaptación el uso de cargas altas podría estar contraindicado por la seguridad del individuo (Bielitzki et al., 2021).

Schoenfeld (2013) establece que el estrés mecánico, el cual se consigue mediante el desplazamiento de altas cargas, es un factor indispensable para generar hipertrofia post-ejercicio, a pesar de que el estrés metabólico también contribuya a la generación de dicha adaptación. Sin embargo, la imposibilidad de algunas personas para soportar el estrés mecánico ha llevado a los científicos a desarrollar alternativas para generar adaptaciones similares a este tipo de entrenamientos, mediante el empleo de cargas bajas. Aquí cobra importancia la técnica BFR (Loenneke et al., 2010).

1.1.4. Adaptaciones y efectos

El objetivo de la utilización de la técnica BFR es aumentar la fuerza y la masa muscular de los sujetos, los cuáles se ven favorecidos al generar una situación de hipoxia e isquemia en la musculatura (Pearson y Hussain, 2014).

1.1.4.1. Entrenamiento de fuerza de baja intensidad sin BFR

Partiendo de la base de que entre los objetivos iniciales de los sujetos con lesiones musculoesqueléticas y/o intervenciones quirúrgicas, encontraríamos prevenir la atrofia por desuso, aumentar la fuerza y aumentar la hipertrofia, pero los métodos de entrenamiento de alta intensidad estarían contraindicados para este tipo de individuos, debemos conocer si el entrenamiento con cargas bajas sería interesante para trabajar con ellos.

Por un lado, encontramos evidencia de que no hay mejoras en la fuerza y la hipertrofia tras seguir un entrenamiento de fuerza de baja intensidad hasta el fallo muscular (Takarada, 2002; Takarada, 2004). Por otro lado, se encontraban pequeñas mejoras en la fuerza de los individuos tras este tipo de procedimientos, pero mucho menor que cuando el entrenamiento se desarrollaba con cargas altas, o con cargas bajas y aplicación de BFR (Takarada, Takazawa, Sato et al., 2000).

1.1.4.2. Entrenamiento de fuerza de baja intensidad con BFR

Ahora bien, cuando el entrenamiento de baja intensidad se combina con restricción vascular, los resultados cambian notablemente.

La combinación citada anteriormente ha generado mejoras en la fuerza y la hipertrofia de los sujetos (Biazon, 2009; Credeur, 2010; Takarada, 2002; Takarada, 2004; Takarada, 2012; Takarada, Takazawa, Sato et al., 2000). Takarada, Takazawa, Sato et al. (2000) exponen que las ganancias de fuerza podrían equipararse a las generadas tras el entrenamiento de fuerza tradicional con cargas altas a pesar de ser algo menores, generando un mayor aumento de la masa muscular.

Las ganancias de hipertrofia se presentan similares tras la aplicación de protocolos de baja intensidad y BFR, ya sea con un alto o bajo volumen de entrenamiento. Además, se asemejarían a las ganancias generadas tras el entrenamiento tradicional de cargas altas. Sin embargo, en cuanto a ganancias de fuerza, en este

caso sí se han encontrado mayores aumentos tras la aplicación de cargas altas (Martín-Hernández et al., 2013).

También encontramos datos que muestran que se pueden desarrollar ganancias de fuerza e hipertrofia mayores cuando el entrenamiento se desarrolla con baja intensidad y BFR, en comparación con el entrenamiento tradicional de alta intensidad (Fernandes et al., 2020).

A pesar de las pequeñas discrepancias entre los estudios, podemos advertir que el entrenamiento de baja intensidad -20-40% 1 RM o máxima contracción voluntaria (MCV)- con restricción vascular genera indudables ganancias en lo que a la fuerza y la hipertrofia se refiere (Scott et al., 2015).

Debemos tener en cuenta que la técnica BFR acelera la aparición de la fatiga, tanto periférica como central, viendo disminuida la capacidad contráctil de las fibras musculares. Sin embargo, tras la finalización del ejercicio se aprecia una recuperación bastante rápida. (Hammer, 2020; Hussman, 2018). Dicha pérdida de capacidad contráctil ve comprometida la capacidad de aplicar fuerza, pero por el contrario, se produce un aumento de la activación de las fibras musculares tipo II (Hussmann, 2018; Takarada, Takazawa, Sato, et al., 2000). Este aumento en la activación de las fibras musculares tipo II muestran relevancia a la hora de explicar las ganancias en fuerza e hipertrofia (Takarada, Takazawa, Sato, et al., 2000).

Teniendo en cuenta las sensaciones subjetivas de los sujetos, atenderemos a los parámetros de dolor y percepción subjetiva del esfuerzo (RPE) de los individuos que se someten a este tipo de entrenamientos. Lixandrão et al. (2019) exponen que el dolor y la RPE de los sujetos sometidos a este tipo de entrenamiento oclusivo son menores que en aquellos que realizan entrenamiento de alta intensidad tradicional o entrenamiento de baja intensidad (ambos acercándose al fallo muscular). Aún así, no toda la evidencia encuentra los mismos resultados, pues Martín-Hernández et al. (2017) evidencia que el entrenamiento de baja intensidad con BFR induce menor RPE, pero mayor dolor que el entrenamiento tradicional de alta intensidad.

A pesar de que existe cierto desacuerdo, resulta interesante tanto el RPE como el dolor van atenuándose con el paso de los entrenamientos en ambos casos, por lo que se afirma que el entrenamiento con BFR genera adaptaciones plásticas en los individuos (Martín-Hernández et al., 2017).

1.1.4.3. Entrenamiento de fuerza de alta intensidad con BFR

No existen mejoras adicionales al entrenamiento de alta intensidad cuando éste es desarrollado con restricción vascular. Es por ello que, la adición de BFR en el entrenamiento con cargas, sólo tiene sentido de ser aplicado cuando se busca el incremento de las adaptaciones conseguidas en combinación con el entrenamiento de baja intensidad (Biazon et al., 2019).

1.1.4.4. Entrenamiento aeróbico con BFR

Además de la aplicación de restricción vascular en el entrenamiento con cargas, ésta también ha sido probada en entrenamiento aeróbico donde la actividad del sujeto se desarrollaba caminando. En estas situaciones se han visto aumentos en la fuerza, la hipertrofia, la hormona de crecimiento (GH) y el hematocrito. Dichas mejoras sólo sucedían cuando la actividad aeróbica se desarrollaba en combinación con BFR (Abe et al., 2006).

1.1.4.5. Aplicación de BFR sin activación muscular

Respecto a la aplicación de restricción vascular en situaciones en las que el sujeto no desarrolla ningún ejercicio activamente, es decir, situaciones donde la actividad muscular es nula, encontramos que no se producen aumentos del área transversal ni de la fuerza, aunque sí se genera una elevación de la GH (Takarada et al., 2004). A pesar de ello, sí se puede decir que en situaciones post-quirúrgicas disminuye el desarrollo de atrofia por desuso (Takarada, Takazawa, Ishii et al., 2000).

1.1.5. Mecanismos involucrados en las adaptaciones y efectos de la estrategia BFR en el entrenamiento de baja intensidad

El entrenamiento de fuerza de baja intensidad con restricción vascular provoca, en el segmento entrenado, mayores acumulaciones de lactato (Takarada, Nakamura et al., 2000; Takarada, Takazawa, Sato et al., 2000), GH (Takarada, 2004; Takarada, Nakamura et al., 2000), fosfato inorgánico, acidez (Takarada et al., 2012), norepinefrina, e interleuquina-6 (IL-6), (Takarada Nakamura et al., 2000), que en el resto de protocolos de entrenamiento expuestos anteriormente.

La oclusión generada con la estrategia no permite aclarar el lactato durante su aplicación, debido a la acumulación de sangre en el segmento (Takarada, Takazawa, Sato et al., 2000). Fernandes et al. (2020) atribuyen las ganancias de fuerza e hipertrofia al aumento de hormonas anabólicas como la GH, la acumulación de metabolitos y el aumento de especies reactivas del oxígeno, todo ello debido a la situación provocada de hipoxia y acidosis muscular. Tendremos en consideración que, el incremento de la GH tras la realización de ejercicio muestra correlación con el desarrollo de hipertrofia de las fibras musculares tipo I y II (McCall et al., 1999).

Takarada, Nakamura et al. (2000) exponen que la elevación del marcador inflamatorio IL-6 sugiere la posible generación de microdaños en las paredes vasculares y/o el tejido vascular, sin embargo, la oclusión del flujo sanguíneo no está asociada a daños graves en los tejidos, puesto que la creatina fosfoquinasa (CPK) y el peróxido lipídico (LP) no aumentan considerablemente.

Ferguson et al. (2018) explican que el entrenamiento de baja intensidad con BFR consigue generar respuestas angiogénicas debido al estímulo isquémico y a la tensión cortante/tangencial en los vasos sanguíneos. Se basan en encontrar aumentos en la fosforilación proteínas quinasas activadas por mitógenos p38 (p38MAPK), así como en la expresión de ácido ribonucleico mensajero (mARN) del coactivador del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PCG-1 α), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el receptor del factor de

crecimiento endotelial vascular (VEGFR), el factor 1α inductible por hipoxia (HIF- 1α) y el óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS).

Larkin et al. (2012) también exponen que este tipo de entrenamientos aumenta la expresión del mRNA postejercicio, en lo relacionado con el desarrollo de angiogénesis en el músculo esquelético. Se basan en los incrementos en la expresión del mRNA en lo referente a VEGF, VEGF-R2, HIF- 1α , óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS).

También existe un aumento de la excitación corticomotora de los sujetos que realizan entrenamiento de baja intensidad con BFR, la cual se presenta rápidamente tras comenzar el entrenamiento y se mantiene hasta 60 minutos tras haberlo finalizado (Brandner et al., 2015).

El aumento de la hipertrofia (Biazon, 2019; Credeur, 2010; Takarada, 2002; Takarada, 2004; Takarada, 2012; Takarada, Takazawa, Sato et al., 2000), y el aumento de la excitación corticomotora (Brandner et al., 2015) tras el entrenamiento de baja intensidad combinado con restricción vascular parecen ser responsables de las ganancias de fuerza de los sujetos.

1.1.6. Inclusión en planes de readaptación

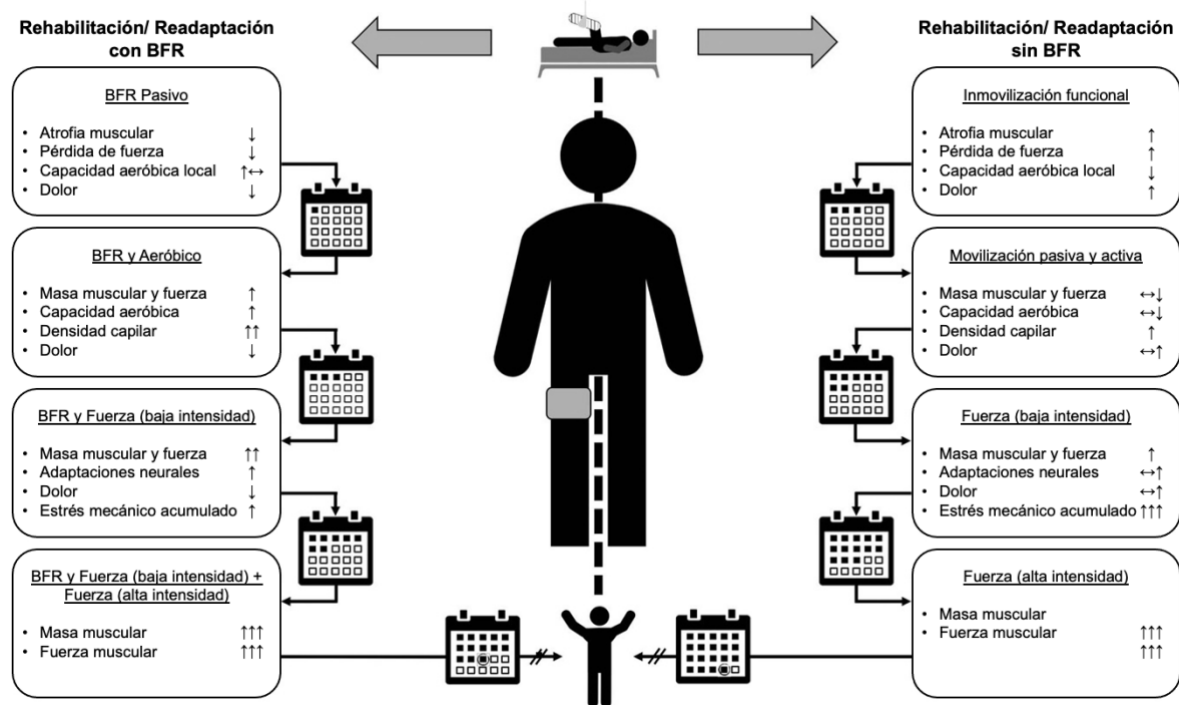
Loenneke et al. (2012) fueron los primeros en desarrollar un modelo de progresión basado en la evidencia para el manejo de lesiones mediante la combinación de la técnica BFR con diferentes métodos de entrenamiento. Desarrollan 4 fases con el objetivo de obtener mayores ganancias de masa muscular y fuerza, en momentos temporales más precoces dentro del proceso de readaptación:

- BFR aplicado sin actividad muscular.
- BFR combinado con ejercicio aeróbico.
- BFR combinado con ejercicio de fuerza de baja intensidad.
- BFR combinado con ejercicio de fuerza de baja intensidad, junto con ejercicio tradicional de fuerza de cargas altas.

Utilizando este modelo de progresión como base, Bielitzki et al. (2021) pusieron el foco en cómo obtener ganancias de tiempo en cuanto a la readaptación de los pacientes se refiere, gracias a esas mejoras funcionales obtenidas mediante el empleo de la BFR. Atienden a que, una recuperación más rápida de los individuos lesionados supondrá un acceso precoz a su vida laboral y social, y que el sistema de salud se vea beneficiado reduciendo la carga de trabajo necesario del personal sanitario, así como los costes económicos. Podemos observar en la **figura 1** la comparativa que realizan en contraposición a un modelo de rehabilitación y readaptación tradicional.

Figura 1

Modelo teórico comparando el proceso de rehabilitación y readaptación de patología musculoesquelética, mediante el uso o ausencia de BFR.



Nota: La figura representa las diferencias entre fases de rehabilitación y readaptación cuando la técnica BFR se encuentra o no presente en el proceso. Los efectos de las intervenciones se exponen con un símbolo en forma de flecha junto a cada uno de éstos (↑ = aumento; ↓ = disminución; ↔ = sin cambios). Adaptado de “Time to save time: beneficial effects of blood flow restriction training and the need to quantify the time potentially saved by its application during musculoskeletal rehabilitation” (p. 3), por R. Bielitzki, 2021, *Physical Therapy*, 101(10).

Bielitzki et al. (2021) explican que, aunque en la **figura 1** se haga alusión a un proceso de rehabilitación/readaptación de miembros inferiores, este modelo puede ser aplicado también en miembros superiores. Aun así, debemos ser conscientes de que en estos últimos, la evidencia existente apoyando la efectividad de la aplicación de BFR es menor.

1.2. La escalada

1.2.1. Descripción

La escalada tiene su origen en el montañismo. Con el incremento de las personas que lo practicaban y la diversificación en varias modalidades, fue considerada y desarrollada como deporte a mediados de la década de 1980 (Schöffl et al., 2012).

La escalada es un deporte en el que el objetivo de los participantes es alcanzar el final de una vía predefinida con la pretensión de no caerse. Estas rutas pueden encontrarse en paredes de roca natural o en paredes con presas artificiales. Dichas vías están graduadas en función de la dificultad técnica de cada una, sirviendo estos grados como medidas de referencia del rendimiento (Jones y Johnson, 2016).

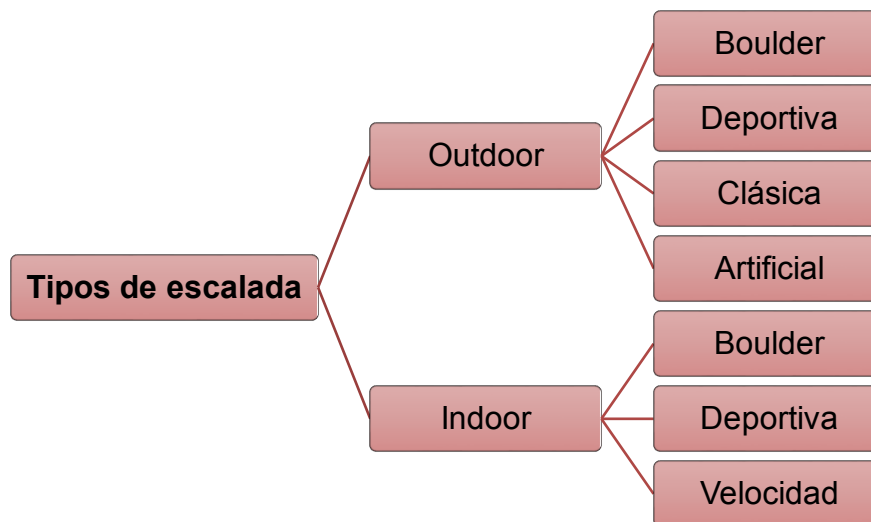
Se trata de un deporte indoor y outdoor que está creciendo en popularidad debido al aumento de los rocódromos, lo cual está acercando su práctica a las áreas urbanas donde el acceso a la escalada en el medio natural presentaba mayores limitaciones. Debemos tener en cuenta que, a pesar de aumentar su popularidad, este deporte conlleva riesgos inherentes (McDonald et al., 2017). A esta creciente popularidad debemos añadirle su debut olímpico en los Juegos Olímpicos de verano de Tokio 2020 (Jones et al., 2018).

1.2.2. Tipos

Los tipos de escalada han sufrido una gran diversificación a medida que este deporte evolucionaba. Utilizaremos aquellos mencionados por Jones et al. (2016) para hacer una clasificación simplificada, la cual podremos observar en la **figura 2**.

Figura 2

Simplificación de los tipos de escalada.



Nota: El esquema representa una simplificación de los tipos de escalada existentes. Adaptado de “A critical review of the incidence and risk factors for finger injuries in rock climbing”, por G. Jones, 2016, *Current Sports Medicine Reports*, 15(6).

1.2.3. Tipos de agarres

Las diferentes vías a las que los escaladores se enfrentan requieren una gran diversidad de maneras de agarrar las presas. Aunque lo más frecuente es que la propia forma de la presa dicte el tipo de agarre que mejor se adapte a ella, una misma presa puede sugerir diferentes formas de ser agarrada, permitiendo movimientos diferentes del cuerpo (Mobråten y Christophersen, 2021). Podemos clasificar los agarres realizados en la escalada según la **figura 3**.

Figura 3

Tipos de agarres en escalada.



Nota: Adaptado de *La biblia de la escalada: entrenamiento técnico, físico y mental para escalar* (p.24-28), por M. Mobråten y S. Christophersen, 2021, Desnivel.

1.3. Lesión de rotura de poleas de los dedos de las manos en escaladores

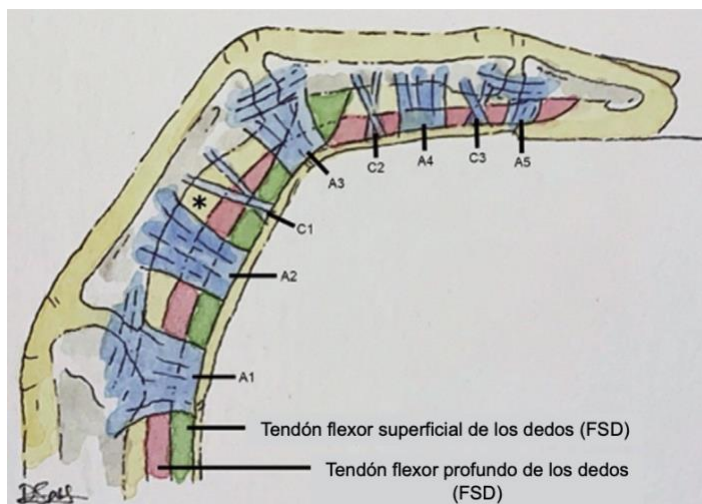
1.3.1. Anatomía estructural y funcional de los dedos de las manos

El complejo estructural que nos interesa conocer para el desarrollo del trabajo es el conocido como “Sistema vaina-polea flexora digital”, el cual permitirá mediante una serie de estructuras que los tendones flexores de los dedos presenten una funcionalidad adecuada.

Zafonte et al. (2014) nos explican que este sistema está formado en su parte profunda por un componente sinovial y en su parte superficial por el conjunto de las poleas. Las poleas están formadas por tejido fibroso que rodea los tendones flexores de los dedos -flexor superficial (FSD) y flexor profundo de los dedos (FPD)- para que éstos puedan desarrollar su función de flexionar las falanges sin separarse de éstas, es decir, permitiendo que puedan trasladar las fuerzas del músculo hacia un movimiento rotatorio de las falanges.

Figura 4

Anatomía del sistema vaina-polea flexora digital.



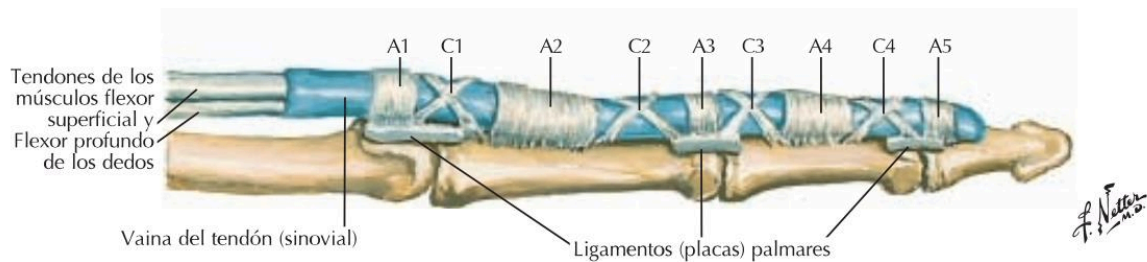
Nota: La imagen muestra el transcurso de los tendones FSD y FPD a través de las poleas (A1-A5 y C1-C3), en una posición de flexión del dedo. Con el símbolo (*) se muestra la distancia tendón-hueso intacta. Adaptado de “Finger flexor pulley injuries in rock climbers” (p.248), por P. H. Miro, 2021, *Wilderness and Environmental Medicine*, 32(2).

Zafonte et al. (2014) explican que cada dedo de la mano presenta 5 poleas anulares (A1 – A5) y 3 poleas cruciformes (C1-C3). A2 y A4 insertan por completo sobre hueso, mientras que el resto de poleas lo hacen en su mayoría sobre placa volar. Podemos apreciar su distribución en la **figura 4**, así como la inserción de los tendones FSD y FPD.

En la **figura 5** podemos apreciar cómo los tendones quedan envueltos por la una vaina sinovial, la cual queda a su vez dispuesta junto a las estructuras óseas mediante las poleas digitales. Apreciamos también la disposición de las placas volares/palmares reforzando las articulaciones interfalángicas y metacarpofalángica.

Figura 5

Anatomía del sistema vaina-polea flexora digital (2).



Nota: La imagen muestra el sistema vaina-polea flexora digital, con la inclusión de la vaina sinovial envolviendo los tendones, en su transcurso por las poleas (A1-A5 y C1-C4). Adaptado de *Atlas de anatomía humana* (p.451), por F. H. Netter, 2011, Elsevier Masson.

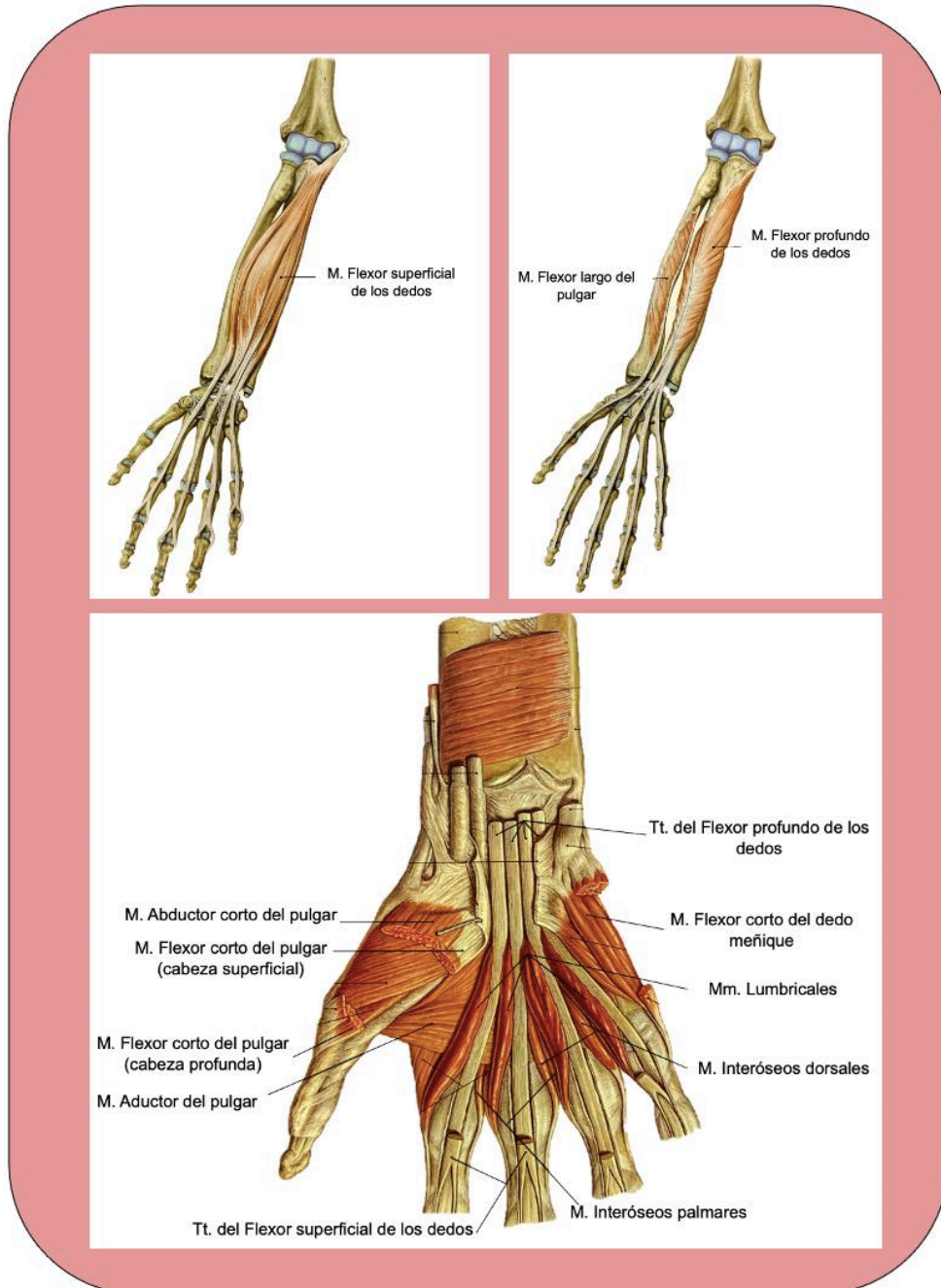
Resulta reseñable que, algunos autores aplican una distribución de cuatro poleas cruciformes (Netter, 2011), mientras que otros hacen constar sólo de tres, haciendo entender que la primera de éstas forma parte de la polea A1 (Miro et al., 2021). En este último caso, las tres poleas corresponderían a las poleas C2-C4 respectivamente.

La funcionalidad del sistema vaina-polea flexora digital requiere de la activación de numerosos músculos, dispuestos tanto en la región del antebrazo como de la mano. Aquellos que participan en la flexión de los dedos como agentes agonistas, según

exponen Paulsen y Waschke (2012b), se muestran incluidos y nombrados en la figura 6.

Figura 6

Musculatura agonista implicada en la flexión de los dedos de las manos.



Nota: En la imagen podemos encontrar varias abreviaturas (M = músculo; Mm = músculos; Tt = Tendones). Adaptado de “Sobotta: Atlas de anatomía humana. Anatomía general y aparato locomotor” (p.175 y 189), por F. Paulsen y J. Waschke, 2012, Elsevier Urban & Fischer.

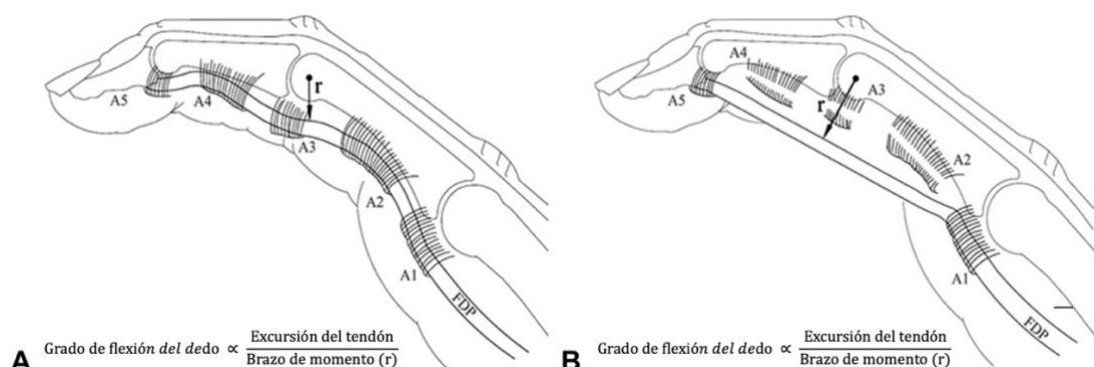
1.3.2. Fisiopatología

La rotura de poleas es una lesión que puede desarrollarse de manera completa o parcial, así como puede producirse de manera aislada en una sola polea o involucrar más estructuras. Cuando tiene lugar, los pacientes suelen presentar sensación de desgarramiento o un chasquido en la zona lesional. La sintomatología más común es dolor e hinchazón en el segmento afectado, y en ocasiones se producen equimosis locales y hematomas. Cuando el fenómeno afecta al menos a dos poleas secuenciales se apreciará el fenómeno “cuerda de arco”, el cual suele involucrar a las poleas A2 y A4 (Zafonte et al., 2014).

En la **figura 7** se visualizan las diferencias en el recorrido del tendón a lo largo de las falanges cuando las poleas están intactas (A) y cuando se produce ruptura completa de éstas (B). Cuando las poleas no presentan desgarramientos, éstas mantienen los tendones flexores de los dedos cerca del eje de rotación de las articulaciones interfalángicas, maximizando el movimiento de flexión de los dedos. En el momento en que las poleas presentan desgarramientos, el tendón pierde su proximidad durante el recorrido respecto de las falanges, por lo que el brazo de momento aumenta, llevando al tendón a una excursión máxima antes de que los dedos hayan conseguido realizar la flexión completa (Zafonte et al., 2014).

Figura 7

Biomecánica del tendón flexor de los dedos en su paso por las poleas.



Nota: Los grados de flexión que el dedo puede alcanzar es proporcional a la excursión del tendón y el brazo de momento. Adaptado de “Pulley flexor system: anatomy, injury and management” (p. 2529), por B. Zafonte, 2014, *The Journal of Hand Surgery*, 39(12).

1.3.3. Incidencia y patogenia

Schöffl et al. (2015) mostraron la incidencia lesional en escaladores, en función del tipo de patología que habían generado durante su actividad entre los años 2009 y 2012. Además, compararon los resultados obtenidos con los recogidos entre los años 1998 y 2001, y publicados por Schöffl et al. (2003). Los datos se muestran en la **tabla I**, y podemos apreciar que, en ambos periodos, la lesión de poleas es la más prevalente entre los escaladores. En la **tabla II** se muestran los datos que expusieron detallando la incidencia de lesión según la polea dañada, mostrando que las poleas A2 y A4 son las que más incidencia de lesión presentan.

Tabla I

Las diez lesiones más frecuentes en escaladores.

Lesiones 1998 - 2001		Lesiones 2009 - 2012	
Lesión de polea	122	Lesión de polea	140
Epicondilitis	51	Capsulitis	87
Tenosinovitis	42	Tenosinovitis	80
Distensión de la cápsula articular del dedo	37	Lesión del labrum superior	51
Abrasión de la piel	34	Epicondilitis	50
Problemas de espalda	24	Pinzamiento acromioclavicular	40
Lesión de rodilla	14	Distensión del tendón flexor del dedo	36
Fractura	14	Contractura de Dupuytren	30
Capsulitis	13	Distensión de la cápsula articular del dedo	25
Ganglión en el tendón flexor del dedo	11	Ganglión en el tendón flexor del dedo	19

Nota: Adaptado de "Injury trends in rock climbers: evaluation of a case series of 911 injuries between 2009 and 2012" (p. 65), por V. Schöffl, 2015, *Wilderness and Environmental Medicine*, 26(1).

Tabla II
Distribución de las lesiones de poleas en los periodos 2009-2012 y 1998-2001.

1998 - 2001	Dedo 1		Dedo 2		Dedo 3		Dedo 4		Dedo 5	
		0		0		47		73		2
2001	A1	A2	A3	A4	C1-3	A2/3	A2/4	A3/4	A2/3/4	
	0	81	6	28	0	4	0	0	3	

2009 - 2012	Dedo 1		Dedo 2		Dedo 3		Dedo 4		Dedo 5	
		0		7		42		89		2
2012	A1	A2	A3	A4	C1-3	A2/3	A2/4	A3/4	A2/3/4	
	1	48	1	61	7	12	1	1	8	

Nota: Adaptado de “Injury trends in rock climbers: evaluation of a case series of 911 injuries between 2009 and 2012” (p. 65), por V. Schöffl, 2015, *Wilderness and Environmental Medicine*, 26(1).

Observamos que, el tercer y cuarto dedo son los más afectados por la lesión de poleas. Vigouroux et al. (2008) explican que biomecánicamente, esto se debe a dos factores. En primer lugar, se debe a que durante los agarres en arqueo las puntas de estos dedos aplican más fuerza que las del resto de los dedos durante los agarres. En segundo lugar, se muestra que durante estos agarres, las poleas del tercer y cuarto dedo reciben fuerzas más próximas a sus umbrales de ruptura.

Debido a las mayores aplicaciones de fuerza generadas con el agarre en arqueo respecto al resto, éste es utilizado por ser el más eficiente, sobre todo en superficies pequeñas. A pesar de ello, se le atribuye la responsabilidad de ser el más propenso a generar lesión de poleas (Schweizer, 2001; Schweizer y Hudek, 2011).

McDonald et al. (2017) afirman que, en relación a las regiones corporales, los miembros superiores son los que más lesiones sufren, siendo los dedos son los más lesionados en los Estados Unidos en cuanto a escaladores se refiere. Las

lesiones más frecuentes son aquellas debidas al sobreuso y al desarrollo de grandes tensiones, como es el caso de la rotura de las poleas.

Haciendo distinción entre los escaladores, en función del grado en el que habitualmente escalan, Wright et al. (2001) exponen que a mayor nivel de escalada mayor es la incidencia de lesión por sobreuso. Concretan que, la mayor incidencia lesional en función del grado habitual de escalada se aprecia en aquellos que superan el 7a+ en boulder, y el 7b+ en escalada deportiva.

1.3.4. Diagnóstico

Schöffl et al. (2003) desarrollaron un sistema de graduación para la lesión de poleas, con la intención de guiar las evaluaciones y los procesos de rehabilitación y readaptación. Podemos ver la clasificación en la **tabla III**, con sus respectivas directrices a seguir.

Tabla III

Clasificación de la lesión de poleas e indicaciones de tratamiento según Shöffl et al. (2003).

	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Lesión	Distensión de polea	Rotura completa de A4 o rotura parcial de A2 o A3	Rotura completa de A2 o A3	Rotura múltiple, rotura simple combinada con daño lumbrical o rotura de ligamento colateral
Tratamiento	Conservador	Conservador	Conservador	Quirúrgico
Inmovilización	No	10 días	10-14 días	14 días postoperatorio
Terapia funcional	Semanas 2-4	Semanas 2-4	Semana 4	Semana 4
Protección de la polea	Vendaje	Vendaje	Termoplástico o anillo de fundición blanda	Termoplástico o anillo de fundición blanda
Actividades deportivas fáciles específicas	Tras 4 semanas	Tras 4 semanas	Tras 6-8 semanas	Cuarto mes
Actividades deportivas completas específicas	Sexta semana	Sexta-Octava semana	Tercer mes	Sexto mes
Vendaje para escalar	3 meses	3 meses	6 meses	>12 meses

Nota: Adaptado de "Pulley injuries in rock climbers" por V. Schöffl, 2003, Wilderness and Environmental Medicine.

2. Justificación

La técnica BFR, aplicada con el ejercicio de fuerza de baja intensidad permite obtener incrementos en la fuerza y la hipertrofia similares a las obtenidas con el entrenamiento de alta intensidad tradicional (Takarada, Takazawa, Sato et al., 2000). Además, las investigaciones sostienen que también se puede implementar esta técnica con resultados positivos en combinación con ejercicio aeróbico (Abe et al., 2006) e incluso inactividad muscular (Takarada, Takazawa, Ishii et al., 2000).

Necesitamos implementar técnicas que, aplicadas en ciertos grupos de población con limitaciones físicas, permitan aumentar su masa muscular y sus niveles de fuerza sin que haya un aumento del riesgo de lesión ni de empeorar su patología, asegurando la seguridad de estos sujetos (Fernandes et al., 2020).

Las investigaciones sobre el uso de la técnica BFR se orientan en su mayoría a regiones musculares de gran tamaño, siendo escasas las centradas en pequeñas zonas como pueden ser las manos o los antebrazos. Tampoco se ha encontrado bibliografía sobre el empleo del BFR dentro de un programa de readaptación de la patología de rotura de poleas de los dedos de las manos en escaladores.

Siendo la rotura de poleas de manos la lesión con mayor incidencia en estos deportistas (Schöffl et al., 2015), la intención de este diseño de estudio iría orientado a conocer si la implementación de la técnica BFR junto con el entrenamiento de fuerza de baja intensidad da lugar al desarrollo de adaptaciones que puedan suponer mejoras en el proceso de rehabilitación y readaptación de estos deportistas.

Para ello, esta investigación irá orientada a conocer dichas adaptaciones en los dedos y antebrazos de escaladores, para asentar unas bases y aproximarnos a futuras líneas de investigación. En función de los resultados de este estudio, estas futuras líneas podrían llevarse a cabo en sujetos que padeciesen la patología de lesión de poleas, pero que, con la evidencia actual, el riesgo de implementar la técnica expuesta actualmente es considerado demasiado alto.

3. Objetivos e hipótesis.

3.1. Objetivo principal.

Comprobar si existen diferencias en los efectos y adaptaciones producidos tras un protocolo de entrenamiento de fuerza de baja intensidad combinado con BFR frente al mismo protocolo sin aplicación de BFR, en los dedos de la mano y el antebrazo de escaladores sin patología.

3.2. Objetivos secundarios.

- Comparar las variaciones en la MCV de flexión isométrica de los dedos de la mano tras un protocolo de entrenamiento de fuerza de baja intensidad con y sin aplicación de BFR, en escaladores sin patología.
- Comparar las variaciones en la circunferencia del antebrazo tras un protocolo de entrenamiento de fuerza de baja intensidad con y sin aplicación de BFR, en escaladores sin patología.
- Comparar las variaciones de concentración de factores angiogénicos (VEGF, HIF-1 α e iNOS) en el torrente sanguíneo tras un protocolo de entrenamiento de fuerza de baja intensidad con y sin aplicación de BFR, en escaladores sin patología.

3.3. Hipótesis principal.

Los efectos y adaptaciones producidos en los dedos de la mano y el antebrazo de escaladores sin patología son mayores tras un protocolo de entrenamiento de fuerza de baja intensidad con aplicación de BFR que sin dicha aplicación.

3.4. Hipótesis secundarias.

- La MCV de flexión isométrica de los dedos de la mano presenta mayores aumentos tras un protocolo de entrenamiento de fuerza de baja intensidad

con aplicación de BFR que sin dicha aplicación, en escaladores sin patología.

- La circunferencia del antebrazo presenta mayores aumentos tras un protocolo de entrenamiento de fuerza de baja intensidad con aplicación de BFR que sin dicha aplicación, en escaladores sin patología.
- Las concentraciones de factores angiogénicos (VEGF, HIF-1 α e iNOS) en el torrente sanguíneo presenta mayores aumentos tras un protocolo de entrenamiento de fuerza de baja intensidad con aplicación de BFR que sin dicha aplicación, en escaladores sin patología.

4. Metodología.

4.1. Diseño.

El estudio propuesto es un ensayo clínico aleatorizado, pues tiene la intención de comparar las adaptaciones que presentan los escaladores en los dedos y los antebrazos tras someterse a dos protocolos de entrenamiento de baja intensidad diferentes, uno combinado con la aplicación de BFR y otro sin dicha aplicación. Los grupos generados para someterse a dichos protocolos estarán formados por sujetos asignados a ellos de manera aleatoria.

Las características del estudio hacen que podamos definirlo como:

- **Experimental:** Porque se llevarán a cabo numerosas intervenciones en los individuos, dentro de un ambiente controlado para conocer las relaciones causales entre las variables propuestas.
- **Prospectivo:** Porque el fenómeno a estudiar comienza al iniciar el estudio, utilizando datos propios.
- **Longitudinal:** Porque se realizará un seguimiento de los sujetos durante las intervenciones, midiendo las variables en un largo intervalo de tiempo a partir del comienzo del propio estudio.
- **Analítico:** Porque la intención es buscar relaciones entre las variables para contrastar hipótesis sobre los resultados.

Con la intención de conseguir una alta calidad metodológica, el estudio propuesto seguirá los criterios CONSORT (Cobos-Carbó y Augustovski, 2011). Además, seguirá los criterios éticos establecidos por la Declaración de Helsinki (World Medical Association [WMA], 2013), y todos los procedimientos estarán aprobados por el Comité Ético de la Universidad Europea de Madrid.

El estudio propuesto será no ciego, pues tanto investigadores como participantes conocerán los grupos de intervención, dadas las evidentes características que diferencian a ambos grupos, las cuáles se expondrán en el transcurso del trabajo.

4.2. Muestra y formación de grupos.

4.2.1. Elección de la muestra.

La muestra del estudio se ha determinado teniendo en cuenta el número de federados en materia de montañismo y escalada en la Comunidad de Madrid, según el Ministerio de Cultura y Deporte (2021). Según los datos que exponen, las licencias federativas expedidas para actividades de montañismo y escalada en la Comunidad han sido 18.778, por lo que trabajaremos con este número como población potencial.

Se entiende que esta cifra es la más cercana a la realidad que podemos tomar como referencia para nuestro estudio, a pesar de no proporcionarnos información exacta sobre el número de escaladores que desarrollan su deporte en la Comunidad de Madrid, puesto que el deporte de la escalada se encuentra dentro de una federación junto con otros deportes relacionados con el mundo del montañismo, por lo que el número de licencias federativas expedidas no corresponde en su totalidad a escaladores. Además, estamos hablando de un deporte que un número incalculable de individuos desarrolla sin licencia federativa.

Así pues, este número nos aproxima al número de escaladores de la comunidad autónoma donde va a desarrollarse el estudio experimental para facilitar la intervención, pues se encuentra en un término medio tanto si le descontásemos el número de federados que no realizan escalada o si le añadiésemos el número total de escaladores que desarrollan su actividad sin licencia federativa.

Para conocer el tamaño de la muestra necesario en el estudio, se ha empleado la plataforma online Survey Monkey (Survey Monkey, 2022). El tamaño de la población empleado ha sido de 18.778, el nivel de confianza un 90% y el margen de error de un 10%. Los dos últimos valores seleccionados nos permitirán tener acceso a una muestra viable para la realización del estudio. Con todo ello, la plataforma nos indica que el tamaño de la muestra debe ser de 68 sujetos.

Los sujetos que participen en el estudio serán escaladores sanos, tanto hombres como mujeres, que cumplan con los criterios de inclusión y exclusión descritos a continuación. Además, deberán haber sido informado sobre los procedimientos que se van a llevar a cabo durante el estudio mediante la hoja de información al participante (**anexo 1**), así como haber firmado el consentimiento informado (**anexo 2**).

4.2.2. Criterios de inclusión.

- Desempeño en modalidades de boulder y/o escalada deportiva.
- Práctica mínima de 5 años de escalada.
- Encadene de al menos tres vías de graduación mayor o igual a 7a+ en boulder y/o 7b+ en escalada deportiva en los últimos 6 meses.
- Residencia habitual en la Comunidad de Madrid.

4.2.3. Criterios de exclusión.

- Presencia de patología en el momento del estudio.
- Existencia de riesgo cardiovascular, pulmonar o metabólico.
- Haber padecido patología de miembro superior en el último año.
- Personas fumadoras.
- Mujeres embarazadas.

4.2.4. Criterios de eliminación.

- Ausencia a alguna de las sesiones programadas.

4.2.5. Muestreo.

El muestreo se realizará de forma no probabilística mediante la técnica de muestreo de bola de nieve. La elección de esta técnica se debe, en su mayoría, a la intención de que el estudio albergue escaladores capaces de escalar vías de con una graduación mínima de 7a+ y 7b+ en boulder y escalada deportiva respectivamente.

Es por ello que, este método nos interesa, pues el grupo investigador reclutará una primera porción de la muestra que cumpla los criterios determinados, con la intención de que estos a su vez identifiquen a otras personas aptas para participar en la investigación.

La elección de escaladores capaces de escalar una graduación mínima se debe a la evidencia que sustenta una mayor incidencia lesional por sobreuso en escaladores que superan ascensos habituales a partir de dichas dificultades (Wright et al., 2001). Además, la inclusión de participantes muy nóveles en el deporte de la escalada implicaría aumentos en las adaptaciones mayores, por lo que podríamos obtener datos poco representativos a la hora de establecer nuevas líneas de investigación en base a los datos obtenidos en este estudio, estando los intereses del ensayo focalizados en las adaptaciones generadas en escaladores que ya presenten adaptaciones previas considerables.

El muestreo buscará alcanzar una proporción equitativa de sujetos hombres y mujeres, pues la finalidad del estudio es que pueda influir en la mayor población posible, dentro de unos criterios determinados. Además, por esta misma razón la búsqueda de licencias federativas de este deporte no hizo diferencia entre las expedidas a mujeres o a hombres. Tendremos en cuenta además que, a pesar de que la evidencia al respecto es muy limitada, Mendonca et al. (2018) exponen que las adaptaciones generadas mediante la aplicación de BFR en el entrenamiento de baja intensidad no se muestran diferentes entre hombres y mujeres.

4.2.6. Formación de los grupos.

Una vez sea reclutada la muestra de 68 sujetos, ésta será dividida en los siguientes grupos de intervención:

- Grupo 1: Entrenamiento de fuerza de baja intensidad sin aplicación de BFR (BI) (n=34).
- Grupo 2: Entrenamiento de fuerza de baja intensidad con aplicación de BFR (BI.BFR) (n=34).

El estudio no incluirá a un grupo que quede sin realizar ningún tipo de entrenamiento puesto que, la intención es conocer los efectos y adaptaciones generadas en los sujetos, en función de la aplicación o ausencia de BFR al realizar un protocolo de fuerza de baja intensidad.

La formación de grupos dispondrá en cada uno de ellos al mismo número de integrantes (n=34), los cuales se repartirán tras un proceso de aleatorización por bloques. En un bloque se encontrarán los sujetos hombres y en el otro las mujeres. De este modo, se conseguirá que cada grupo de intervención cuente con un porcentaje equilibrado de hombres y mujeres, haciendo que los resultados obtenidos no pierdan fiabilidad por haber desarrollado un desequilibrio entre los grupos. Dicho proceso se realizará mediante el software Microsoft Excel versión 18.0.

Al finalizar el estudio, el grupo investigador se comprometerá a seguir el protocolo que mejores resultados haya obtenido con los participantes del grupo que se haya visto menos beneficiado por las intervenciones y que así lo deseen.

4.3. Variables y material de medida.

4.3.1. Variables independientes.

Son las variables que controla el equipo investigador. En este caso son los protocolos de ejercicio físico:

- BI.
- BI.BFR.

4.3.2. Variables dependientes.

Son las variables que no controla el equipo investigador, viéndose repercutidas directamente por las variables independientes. Servirán para contrastar las hipótesis planteadas:

- MCV de flexión isométrica de los dedos de la mano. Se trata de una variable cuantitativa y continua. Para realizar su medición se empleará el dinamómetro hidráulico de Baseline, que es el empleado por Credeur et al. (2010). Las unidades de medida serán expresadas en kilogramos (kg).

Se pedirá a cada sujeto que se disponga en bipedestación agarrando el dinamómetro con su mano dominante a lo largo de su cuerpo hacia caudal. Se le pedirá que realice la máxima contracción voluntaria apretando tan fuerte como pueda durante 3 segundos. Esto se repetirá 3 veces, con descansos de 1 minuto. La media de los 3 intentos se considerará la fuerza máxima de contracción (Credeur et al., 2010).

- Circunferencia del antebrazo. Es una variable cuantitativa y continua. Su medición se llevará a cabo mediante la cinta métrica Gulik, de la marca Mabis, tal y como desarrollan en su estudio Fernandes et al. (2020). Las unidades de medida serán expresadas en centímetros (cm).

Se empleará la cinta métrica para examinar la circunferencia del antebrazo, colocándose ésta 10 cm distal al punto medio entre el epicóndilo lateral y la apófisis del olécranon del antebrazo dominante (Credeur et al., 2010).

- Concentración de factores angiogénicos (VEGF, HIF-1 α e iNOS). Esta variable es cuantitativa y continua. Su medición se desarrollará mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, que es como obtienen los resultados de esta variable Larkin et al. (2012). Se emplearán kits de la marca Thermo Fisher Scientific, cuyas mediciones se exponen en pg/mL.

Su realización se desarrollará mediante el análisis de las muestras sanguíneas de los participantes, para lo cual se seguirán los protocolos del fabricante, dispuestos en los **anexos 3, 4 y 5**.

4.3.3. Variables intervinientes.

Son variables que no controla el equipo investigador, pero que pueden influir en la repercusión de las variables independientes sobre las dependientes:

- Sexo. Se trata de una variable cualitativa y nominal. Se diferenciará entre hombres y mujeres.

4.4. Procedimientos.

El desarrollo del estudio tendrá una duración total de 12 meses, en los cuales transcurrirán 5 etapas (**tabla IV**):

Etapa 1. Diseño del estudio y aprobación por el comité ético. Esta etapa tendrá una duración de 3 meses y en ella se realizará una búsqueda bibliográfica acerca del estado actual del tema planteado para conocer las últimas actualizaciones sobre el mismo y los procedimientos llevados a cabo por otros autores. A raíz de esta búsqueda bibliográfica se generará la pregunta de investigación. Después se desarrollarán unos objetivos y unas hipótesis con la intención de dar respuesta a dicha pregunta, así como se describirán las variables que van a ser estudiadas y se definirá la muestra que requiere el estudio, estableciendo unos criterios de selección para la participación de los sujetos. Además, se realizará un organigrama donde incluir los horarios en los que se realizarán las intervenciones, así como los turnos que corresponden a cada sujeto e investigador. Esta etapa será desarrollada por el investigador principal.

Etapa 2. Reclutamiento y selección de la muestra. La duración de esta etapa será de 3 meses y en ella participarán el investigador principal y los entrenadores/as del proyecto. Se encargarán de reclutar a los participantes del estudio, por lo que

será importante su relación directa con el mundo de la escalada dentro de la Comunidad de Madrid. Se realizará un muestreo por bola de nieve para conseguir alcanzar la muestra necesaria que cumpla los criterios de selección. Los miembros del equipo investigador expuestos anteriormente contactarán con escaladores que conozcan previamente para proponerles su participación en la investigación, y se les pedirá a su vez que identifiquen a otros sujetos que cumplan los requisitos para plantearles también su adhesión al estudio.

Se tomarán los datos de los participantes para poderles explicar en detalle los procedimientos que van a llevarse a cabo. Para ello se les hará entrega de la hoja de información al participante (**anexo 1**) y se les pedirá que firmen el consentimiento informado (**anexo 2**). Los investigadores quedarán a disposición de los participantes para resolver todas las dudas que puedan surgirles con relación al estudio. Después, se determinarán los horarios de cada participante y quedarán reflejados en el organigrama.

Cuando la muestra requerida sea alcanzada, los sujetos serán asignados a un grupo de intervención y se les asignará un código personal para reclutar los datos de las mediciones y asignarlas a cada participante mediante el software Microsoft Excel en su versión 18.0. Dicha distribución de los grupos se realizará mediante una aleatorización por bloques, formados cada uno de ellos por integrantes del mismo sexo. Después se dividirán en dos grupos ($n=34$) de manera aleatoria también mediante el software Microsoft Excel versión 18.0, asegurándonos de este modo de que cada intervención presenta el mismo número de hombres que de mujeres. Esta parte de la etapa será realizada por el investigador principal.

Etapa 3. Intervención y recogida de datos. Los protocolos de entrenamiento seguirán las dinámicas de Credeur et al. (2010), en combinación con los modelos de prescripción de ejercicio mediante el uso de BFR propuestos por Patterson et al. (2019), para garantizar la seguridad de los individuos. Serán realizados por los entrenadores/as del grupo investigador.

Las intervenciones tendrán una duración de 4 semanas, asistiendo cada participante 3 días semanales (Fernandes, 2020; Credeur, 2010; Hunt, 2012), una sesión previa de medición que tendrá lugar 48 horas antes de su primera sesión y una sesión de medición posterior desarrollada 48 horas después de la última sesión.

Los participantes habrán sido informados de la necesidad de no haber ingerido cafeína los días que se acudan a las sesiones, así como de evitar actividad física extenuante en las 12 horas previas y el consumo de alcohol en las anteriores 48 horas (Credeur et al., 2010).

Cada sesión de intervención tendrá destinada una duración de 30 minutos. Los miembros de cada grupo realizarán el siguiente protocolo:

Los participantes realizarán flexión isométrica de dedos con su mano dominante en el dinamómetro durante 20 minutos, a una cadencia de 15 compresiones por minuto (4 segundos cada contracción), guiadas por un metrónomo. El modelo utilizado será Beijing Buluobang. (2020). *Metrónomo – práctico metrónomo*. (1.2). [Aplicación móvil]. Esto se debe a que es un software gratuito con facilidad de uso, que reducirá los costes de la investigación y facilitará su desarrollo. Las contracciones deben generarse al 30% de la MCV de cada sujeto. A los 10 minutos se realizará un descanso de 1 minuto sin presión del manguito en el grupo BI.BFR. La posición de los participantes será en sedestación, con el antebrazo y el dinamómetro apoyados sobre una superficie horizontal.

Los miembros del grupo BI realizarán este protocolo sin aplicación de manguito presurizado, mientras que el grupo BI.BFR sí lo utilizará, siendo su aplicación realizada por parte del entrenador/a que tengan asignado. La presión ejercida con el manguito presurizado será aquella que represente el 80% de la presión de oclusión arterial, la cual se valorará antes de cada sesión en cada individuo. La disposición del manguito será en la parte distal del brazo, próxima al olécranon.

La presión de oclusión arterial definida para cada sesión será determinada mediante fonendoscopio. Se empleará el modelo de doble campana de Riester 2.0. Con él se detectará el pulso radial del antebrazo y a medida que el manguito aumenta su presión (medida en milímetros de mercurio (mmHg) progresivamente, el fonendoscopio permitirá detectar el momento en el que el pulso desaparece, determinándose así el valor del 100% de oclusión arterial. De este modo, sin utilizar el sistema Doppler podremos abaratar costes y agilizar el transcurso de las intervenciones. Inmediatamente después se calculará el 80% de la presión de oclusión arterial para desarrollar la intervención.

El manguito presurizado que se empleará en las intervenciones con el grupo BI.BFR será el Hokanson E20, debido a su rapidez de inflado, lo cual ayudará agilizando las intervenciones y a aumentar la precisión con los tiempos de inflado. Hammer et al., (2020) lo emplean en su investigación.

Para contabilizar los tiempos de duración de las 2 series de 10 minutos y su respectivo descanso de 1 minuto de cada protocolo, se utilizará el cronómetro Apple. (2021). [Aplicación móvil]. Su empleo también se debe a que se trata de un software gratuito con facilidad de uso.

La recogida de datos de la sesión pre-intervenciones y de la sesión post-intervenciones será desarrollada 48 horas antes de la primera sesión de intervención y 48 horas después de la última sesión de intervención, respectivamente. En primer lugar, se medirá la circunferencia del antebrazo, acto seguido se realizará la medición de la máxima contracción voluntaria y finalmente, tras un descanso de 5 minutos se realizará la toma de muestras sanguíneas para el posterior análisis de la concentración de factores angiogénicos.

Los datos sobre la máxima contracción voluntaria y le circunferencia del antebrazo serán obtenidos por los entrenadores/as, mientras que las muestras sanguíneas serán recolectadas por el enfermero/a. El ensayo inmonoabsorbente ligado a enzimas será realizado por el bioquímico, tras la toma de muestras sanguíneas realizadas en cada una de las sesiones pre- y post-intervenciones.

Esta etapa se desarrollará en las instalaciones de la Facultad de la Actividad Física y del Deporte de la Universidad Europea de Madrid (C. Tajo, s/n, 28670, Villaviciosa de Odón, Madrid).

Cada semana de intervención presenta el desarrollo de sus sesiones los lunes, miércoles y viernes, teniendo lugar 8 turnos de 30 minutos cada uno por la mañana, y los mismos por la tarde. Al haber 4 entrenadores, cada uno de ellos tendrá asignados 16 participantes diarios en cada uno de esos días. De este modo, la muestra está repartida a lo largo de todo el periodo de intervenciones entre los entrenadores que forman parte del equipo investigador.

Etapa 4. Análisis estadístico. Tras la obtención de los datos se establece un mes para el desarrollo de su análisis. El estadístico/a del equipo investigador será quien se encargue de esta función, la cual se llevará a cabo mediante el software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS).

Etapa 5. Divulgación. Esta será la última etapa de estudio experimental llevado a cabo. Se estima una duración de 4 meses y será realizado por el investigador principal y los entrenadores/as. Consta de las tareas de redacción del artículo, la presentación en congresos científicos, el envío a editoriales con intención de publicación en alguna revista científica y por último, la redacción de una memoria final.

Tabla IV
Etapas de desarrollo.

	Mes											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Diseño y comité ético	X	X	X									
Reclutamiento y selección de la muestra				X	X	X						
Intervención y recogida de datos							X					
Análisis estadístico								X				
Divulgación									X	X	X	X

Nota: Etapas del desarrollo del estudio y duración de cada una de ellas. Elaboración propia.

4.5. Análisis de datos.

El análisis de los datos se llevará a cabo mediante el programa SPSS, en su versión 27.0.1.

Se emplearán estadísticos descriptivos para variables cuantitativas, que serán los siguientes: media, desviación típica y apuntamiento. Además, al ser las variables cuantitativas, será necesario conocer si la distribución obtenida es normal o no normal, para el desarrollo de la estadística inferencial, por lo que pueden darse dos casos:

1. Distribución normal: Se realizarán pruebas paramétricas para muestras relacionadas (Prueba t para pruebas relacionadas) para conocer las diferencias dentro del mismo grupo en los diferentes momentos de medición.

Se desarrollarán también pruebas paramétricas para muestras independientes (Prueba t para pruebas independientes) para conocer las diferencias de cada una de las variables entre los diferentes grupos.

2. Distribución no normal: Se realizarán pruebas no paramétricas para muestras relacionadas (Wilcoxon matching pairs test) para conocer las diferencias dentro del mismo grupo en los diferentes momentos de medición. Se desarrollarán también pruebas no paramétricas para muestras independientes (Mann-Whitney U test) para conocer las diferencias de cada una de las variables entre los diferentes grupos.

5. Equipo investigador.

Encontramos los componentes del equipo investigador y las funciones a desempeñar por cada uno de ellos en la **tabla V**.

Tabla V

Equipo investigador y asignación de funciones.

Cargo de responsabilidad	Número de puestos	Formación	Funciones
Investigador principal	1	Grado en CCAFYD y Grado en Fisioterapia	<ul style="list-style-type: none"> · Diseño del estudio. · Captación de la muestra y formación de grupos. · Divulgación. · Dirección y coordinación del proyecto.
Entrenadores/as	4	Grado en CCAFYD (experiencia en escalada)	<ul style="list-style-type: none"> · Realización de las intervenciones. · Desarrollo de las mediciones de fuerza máxima. · Captación de la muestra. · Divulgación.
Enfermero/a	1	Grado en Enfermería	<ul style="list-style-type: none"> · Toma y manipulación de las muestras sanguíneas.
Bioquímico	1	Grado en Bioquímica	<ul style="list-style-type: none"> · Análisis de las muestras sanguíneas.
Estadístico/a	1	Grado en Estadística	<ul style="list-style-type: none"> · Análisis de los resultados obtenidos en las intervenciones.

Nota: Componentes del equipo investigador y funciones asignadas en el estudio. Elaboración propia.

6. Viabilidad y limitaciones del estudio.

6.1. Viabilidad del estudio.

El cumplimiento de las fases propuestas para la realización del estudio facilitará su viabilidad. Teniendo en cuenta las variables dependientes, podemos confirmar que podemos dar respuestas a las hipótesis generadas, y cumplir con los objetivos marcados en el proyecto.

Además, la cercanía a la población del estudio por parte del grupo investigador facilitará el reclutamiento de la muestra. Es por ello la necesidad de que los investigadores tengan relación con el mundo de la escalada en la Comunidad de Madrid.

La duración de las intervenciones no es muy extensa, lo cual facilitará la adhesión de los participantes a los procedimientos determinados para la realización del estudio, sin que el estudio pierda calidad por disminución de la muestra.

En último lugar, cabe mencionar que el proyecto cuenta con desarrollarse en las instalaciones de la Universidad Europea de Madrid, lo cual disminuye costes y permite el desarrollo íntegro de los procedimientos demandados en el estudio, favoreciendo la viabilidad del mismo.

6.2. Limitaciones del estudio.

El desarrollo del estudio cuenta con alguna limitación que podría disminuir la calidad de los resultados del mismo. En primer lugar, los resultados que se obtengan pueden verse afectados por variables control no incluidas en el estudio, como son la alimentación y el descanso de los sujetos. Además, debemos incluir que las intensidades empleadas con cada sujeto durante las intervenciones se van a basar en el resultado de la máxima contracción voluntaria medida en la sesión pre-intervención, la cual no se volverá a medir hasta finalizar las intervenciones, por lo que debemos tener en cuenta que dicha capacidad máxima podría ir variando

durante el transcurso de las semanas, y la intensidad teórica empleada del 30% podría no ser tan exacta.

En el momento de diseñar el estudio, se encontró como limitación para poder desarrollar una intervención con escaladores con lesión de poleas, la escasa literatura científica que relacionase la técnica BFR y las adaptaciones en dedos y antebrazos, así como con una población de escaladores. Es por ello que, el estudio actual se ha orientado a generar esa base de conocimiento que sirva para, en un futuro, poder diseñar intervenciones en escaladores que presenten la patología propuesta, con la intención de facilitar sus procesos de readaptación para que vuelvan a su práctica deportiva en el menor tiempo posible y tomando los menores riesgos posibles.

Otra limitación importante que ha tenido el estudio ha sido determinar la población sobre la que seleccionar la muestra. Esto se ha debido a que las federaciones madrileña y española que acogen al deporte de la escalada, están formadas por diversos deportes relacionados con la montaña. También es reseñable que, se trata de un deporte practicado por muchas personas que no presentan licencia federativa, por lo que estimar la población sobre la cual hay que determinar la muestra representativa para el estudio ha sido una limitación en el desarrollo del mismo. Es por ello que, se ha decidido utilizar el valor de licencias expedidas por la Comunidad de Madrid en materia de montañismo y escalada en 2021, ya que dicho valor se encuentra entre medias de aquel en el que se restasen las licencias dedicadas a otros deportes de montaña alejados de la escalada, y aquel en el que se añadiesen los escaladores que realizan su actividad deportiva sin licencia federativa.

Por último, al realizarse la intervención mediante el uso de dinamómetro a una contracción voluntaria del 30% respecto a la MCV de cada participante, siguiendo las intervenciones de Credeur et al. (2010), la aplicación de fuerza puede no ser tan exacta por parte de los participantes. Reducir este posible error es una de las razones por las que el estudio es planteado realizándose con la mano dominante de los participantes para facilitar la ejecución del protocolo, entendiendo que el

control de la herramienta será más precisa que si se realizase con la mano no dominante.

7. Referencias bibliográficas.

- Abe, T., Kearns, C. H., y Sato, Y. (2006). Muscle size and strength are increased following walk training with restricted venous blood flow from leg muscle, Kaatsu-walk training. *Journal of Applied Physiology*. 100(5), 1460-1466. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01267.2005>
- American College of Sports Medicine. (2009). Progression models in resistance training for healthy adults. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 41(3), 687-708. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181915670>
- Apple. (2021). *Clock*. [Aplicación móvil]. App Store. <https://apps.apple.com/es/app/clock/id1584215688>
- Beijing Buluobang. (2020). *Metrónomo – práctico metrónomo*. (1.2). [Aplicación móvil]. App Store. <https://apps.apple.com/es/app/metr%C3%B3nomo-pr%C3%A1ctico-metr%C3%B3nomo/id1066619012>
- Biazon, T. M. P. C., Ugrinowitsch, C., Soligon, S. M., Oliveira, R. M., Bergamasco, J. G., Borghi-Silva, A., y Libardi, C. A. (2019). The association between muscle deoxygenation and muscle hypertrophy to blood flow restricted training performed at high and low loads. *Frontiers in Physiology*. 10. 1-12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00446>
- Bielitzki, R., Behrendt, T., Behrens, M., y Schega, L. (2021). Time to save time: Beneficial effects of blood flow restriction training and the need to quantify the time potentially saved by its application during musculoskeletal rehabilitation. *Physical Therapy*. 101(10), 1-9. <https://doi.org/10.1093/ptj/pzab172>
- Brandner, C. R., Warmington, S. A., y Kidgell, D. J. (2015). Corticomotor excitability is increased following an acute bout of blood flow restriction resistance

exercise. *Frontiers in Human Neuroscience*. 9. 1-10.
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2015.00652>

Cobos-Carbó, A. y Augustovski, F. (2011). Declaración CONSORT 2010: actualización de la lista de comprobación para informar ensayos clínicos aleatorizados de grupos paralelos. *Medicina clínica*. 137(5), 213-215.
<https://doi.org/10.1016/j.medcli.2010.09.034>

Credeur, D. P., Hollis, B. C., y Welsch, M. A. (2010). Effects of handgrip training with venous restriction on brachial artery vasodilation. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 42(7), 1296-1302.
<https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181ca7b06>

Ferguson, R. A., Hunt, J. E. A., Lewis, M. P., Mertin, N. R. W., Player, D. J., Stangier, C., Taylor, C. W., y Turner, M. C. (2018). The acute angiogenic signalling response to low-load resistance exercise with blood flow restriction. *European Journal of Sport Science*. 18(3), 397-406.
<https://doi.org/10.1080/17461391.2017.1422281>

Fernandes, D. Z., Weber, V. M. R., da Silva, M. P. A., de Lima-Stavinski, N. G., de Oliveira, L. E. C., Casoto-Tracz, E. H., Ferreira, S. A., da Silva, D. F., y Queiroga, M. R. (2020). Effects of blood flow restriction training on handgrip strength and muscular volume of young women. *International Journal of Sports Physical Therapy*. 15(6), 901-909.
<https://doi.org/10.26603/ijsppt20200901>

Hammer, S. M., Alexander, A. M., Didier, K. D., y Barstow, T. J. (2020). Influence of blood flow occlusion on muscular recruitment and fatigue during maximal-effort small muscle-mass exercise. *The Journal of Physiology*. 598(19), 4293-4306. <https://doi.org/10.1113/JP279925>

Hughes, L., Rosenblatt, B., Paton, B., y Patterson, S. D. (2018). Blood flow restriction training in rehabilitation following anterior cruciate ligament

- reconstructive surgery: a review. *Techniques in Orthopaedics*. 33(2), 106-113. <https://doi.org/10.1097/bto.0000000000000265>
- Husmann, F., Mittlmeier, T., Bruhn, S., Zschorlich, V., y Behrens, M. (2018). Impact of blood flow restriction exercise on muscle fatigue development and recovery. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 50(3), 436-446. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001475>
- Jessee, M. B., Buckner, S. L., Mouser, J. G., Mattocks, K. T., Dankel, S. J., Abe, T., Bell, Z. W., Bentley, J. P., y Loenneke, J. P. (2018). Muscle adaptations to high-load training and very low-load training with and without blood flow restriction. *Frontiers in Physiology*. 9. 1-11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01448>
- Jones, G., y Johnson, M. I. (2016). A critical review of the incidence and risk factors for finger injuries in rock climbing. *Current Sports Medicine Reports*. 15(6), 400-409. <https://doi.org/10.1249/JSR.0000000000000304>
- Jones, G., Schöffl, V., y Johnson, M. I. (2018). Incidence, diagnosis, and management of injury in sport climbing and bouldering: A critical review. *Current Sports Medicine Reports*. 17(11), 396-401. <https://doi.org/10.1249/JSR.0000000000000534>
- Larkin, K. A., Macneil, R. G., Dirain, M., Sandesara, B., Manini, T. M., y Buford, T. W. (2012). Blood flow restriction enhances post-resistance exercise angiogenic gene expression. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 44(11), 2077-2083. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3182625928>
- Lixandrão, M. E., Roschel, H., Ugrinowitsch, C., Miquelini, M., Alvarez, I. F., y Libardo C. A. (2019). Blood-flow restriction resistance exercise promotes lower pain and ratings of perceived exertion compared with either high- or low-intensity resistance exercise performed to muscular failure. *Journal of Sport Rehabilitation*. 28(7), 706-710. <https://doi.org/10.1123/jsr.2018-0030>

- Loenneke, J. P., Thiebaud, R. S., y Bemben, M. G. (2014). Blood flow restriction pressure recommendations: the hormesis hypothesis. *Elsevier*. 82(5), 623-626. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2014.02.023>
- Loenneke, J. P., Wilson, G. J., y Wilson, J. M. (2010). A mechanistic approach to blood flow occlusion. *International Journal of Sports Medicine*. 31(1), 1-4. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1239499>
- McCall, G. E., Byrnes, W. C., Fleck, S. T., Dickinson, A., y Kraemer, W. J. (1999). Acute and chronic hormonal responses to resistance training designed to promote muscle hypertrophy. *Canadian Journal of Applied Physiology*. 24(1), 96-107. <https://doi.org/10.1139/h99-009>. PMID: 9916184
- McDonald, J. W., Henrie, A. M., Teramoto, M., Medina, E., y Willick, S. E. (2017). Descriptive epidemiology, medical evaluation, and outcomes of rock climbing injuries. *Wilderness and Environmental Medicine*. 28(3), 185-196. <https://doi.org/10.1016/j.wem.2017.05.001>
- Manini, T. M., y Clark, B. C. (2009). Blood flow restricted exercise and skeletal muscle health. *Exercise and Sport Sciences Reviews*. 37(2), 78-85. <https://doi.org/10.1097/JES.0b013e31819c2e5c>
- Martín-Hernández, J., Marín, P. J., Menéndez, H., Ferrero, C., Loenneke, J. P., y Herrero, A. J. (2013). Muscular adaptations after two different volumes of blood flow-restricted training. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*. 23(2), 114-120. <https://doi.org/10.1111/sms.12036>
- Martín-Hernández, J., Ruiz-Agudo, J., Herrero, J. A., Loenneke, J. P., Aagard, P., Cristi-Montero, C., Menéndez, H., y Marín, P. J. (2017). Adaptation of perceptual responses to low-load blood flow restriction training. *The Journal of Strength and Conditioning Research*. 31(3), 765-772. <https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000001478>

- Mendonca, G. V., Borges, A., Teodósio, C., Matos, P., Correia, J., Vila-Chã, C., Mil-Homens, P., y Pezarat-Correia, P. (2018). Muscle fatigue in response to low-load blood flow-restricted elbow-flexion exercise: are there any sex differences?. *European Journal of Applied Physiology*. 118(10), 2089-2096. <https://doi.org/10.1007/s00421-018-3940-x>
- Ministerio de Cultura y Deporte. Gobierno de España. (2021). Estadística de deporte federado 2020. <https://www.culturaydeporte.gob.es/servicios-al-ciudadano/estadisticas/cultura/mc/deportedata/deporte-federado/resultados-deporte-federado.html>
- Miro, P. H., vanSonnenberg, E., Sabb, D. M., y Schöffl, V. (2021). Finger flexor pulley injuries in rock climbers. *Wilderness and Environmental Medicine*. 32(2), 247-258. <https://doi.org/10.1016/j.wem.2021.01.011>
- Mobrâten, M., y Christophersen, S. (2021). *La biblia de la escalada: entrenamiento técnico, físico y mental para escalar*. Desnivel.
- Netter, F. H. (2011). *Atlas de anatomía humana*. Elsevier Masson.
- Patterson, S. D., Hughes, L., Warmington, S., Burr, J., Scott, B. R., Owens, J., Abe, T., Nielsen., Augusto-Libardi, C., Laurentino, G., Rodrigues-Nero, G., Brandner, C., Martin-Hernandez, J., y Loenneke, J. (2019). Blood Flow Restriction exercise: Considerations of methodology, application, and safety. *Frontiers in Physiology*. 10. 1-15. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00533>
- Paulsen, F., y Waschke, J. (2012a). *Sobotta: Atlas de anatomía humana. Anatomía general y aparato locomotor (23ª ed)*. Elsevier Urban & Fischer.
- Paulsen, F., y Waschke, J. (2012b). *Sobotta: Atlas de anatomía humana. Tablas de músculos, articulaciones y nervios (2ª ed)*. Elsevier Urban & Fischer.

- Pearson, S. J., y Hussain, S. R. (2014). A review of the mechanism of blood flow restriction resistance training-induced muscle hypertrophy. *Sports Medicine*. 45(2), 187-200. <https://doi.org/10.1007/s40279-014-0264-9>
- Schoenfeld, B. J. (2013). Potential mechanisms for a role of metabolic stress in hypertrophic adaptations to resistance training. *Sports Medicine*. 43(3), 179-194. <https://doi.org/10.1007/s40279-013-0017-1>
- Schöffl, V., Hockholzer, T., Winkelmann, H. P., y Strecker, W. (2003). Pulley injuries in rock climbers. *Wilderness and Environmental Medicine*. 14(2), 94-100. [https://doi.org/10.1580/1080-6032\(2003\)014\[0094:piirc\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1580/1080-6032(2003)014[0094:piirc]2.0.co;2)
- Schöffl, V., Morrison, A., Schöffl, I., y Küpper, T. (2012). The epidemiology of injury in mountaineering, rock and ice climbing. *Medicine and Sport Science*. 58, 17-43. <https://doi.org/10.1159/000338575>
- Schöffl, V., Popp, D., Küpper, T., y Schöffl, I. (2015). Injury trends in rock climbers: evaluation of a case series of 911 injuries between 2009 and 2012. *Wilderness and Environmental Medicine*. 26(1), 62-67. <https://doi.org/10.1016/j.wem.2014.08.013>
- Schweizer, A. (2001). Biomechanical properties of the crimp grip position in rock climbers. *Journal of Biomechanics*. 34(2), 217-223. [https://doi.org/10.1016/s0021-9290\(00\)00184-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9290(00)00184-6)
- Schweizer, A., y Hudek, R. (2011). Kinetics of crimp and slope grip in rock climbing. *Journal of Applied Biomechanics*. 27(2), 116-121. <https://doi.org/10.1123/jab.27.2.116>
- Scott, B. R., Loenneke, J. P., Slattery, K. M., y Dascombe. (2015). Exercise with blood flow restriction: an updated evidence-based approach for enhanced muscular development. *Sports Medicine*. 45(3), 313-25. <https://doi.org/10.1007/s40279-014-0288-1>

- Survey Monkey. (2022). *Calculadora del tamaño de muestra*.
<https://es.surveymonkey.com/mp/sample-size-calculator/>
- Takada, S., Okita, K., Suga, T., Omokawa, M., Kadohuchi, T., Sato, T., Takahashi, M., Yokota, T., Hirabayashi, K., Morita, N., Horiuchi, M., Kinugawa, S., y Tsutsui, H. (2012). Low-intensity exercise can increase muscle mass and strength proportionally to enhanced metabolic stress under ischemic conditions. *Journal of Applied Physiology*. 113(2), 199-205.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00149.2012>
- Takarada, Y., Nakamura, Y., Aruga, S., Onda, T., Miyazaki, S., y Ishii, N. (2000). Rapid increase in plasma growth hormone after low-intensity resistance exercise with vascular occlusion. *Journal of Applied Physiology*. 88(1), 61-65. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.88.1.61>
- Takarada, Y., Sato, Y., y Ishii, N. (2002). Effects of resistance exercise combined with vascular occlusion on muscle function in athletes. *European Journal of Applied Physiology*. 86(4), 308-314. <https://doi.org/10.1007/s00421-001-0561-5>
- Takarada, Y., Takazawa, H., y Ishii, N. (2000). Applications of vascular occlusion diminish disuse atrophy of knee extensor muscles. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 32(12), 2035-2039. <https://doi.org/10.1097/00005768-200012000-00011>
- Takarada, Y., Takazawa, H., Sato, Y., Takebayashi, S., Tanaka, Y., y Naokata, I. (2000). Effects of resistance exercise combined with moderate vascular occlusion on muscular function in humans. *Journal of Applied Physiology*. 88(6), 2097-2106. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.88.6.2097>
- Takarada, Y., Tsuruta, T., y Ishii, N. (2004). Cooperative effects of exercise and occlusive stimuli on muscular function in low-intensity resistance exercise

with moderate vascular occlusion. *The Japanese Journal of Physiology*. 54(6), 585-592. <https://doi.org/10.2170/jjphysiol.54.585>

Vigouroux, L., Quaine, F., Paclet, F., Colloud, F., y Moutet, F. (2008). Middle and ring fingers are more exposed to pulley rupture than index and little during sport-climbing: a biomechanical explanation. *Clinical Biomechanics*. 23(5), 562-570. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiomech.2007.12.009>

World Medical Association. (2013). World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *Journal of the American Medical Association*. 310(20), 2191-2194. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>

Wright, D. M., Royle, T. J., y Marshall, T. (2001). Indoor rock climbing: who gets injured?. *British Journal of Sports Medicine*. 35(3), 181-185. <https://doi.org/10.1136/bjsm.35.3.181>

Zafonte, B., Rendulic, D., y Szabo, R. M. (2014). Flexor pulley system: anatomy: injury, and management. *The Journal of Hand Surgery*. 39(12), 2525-2532. <https://doi.org/10.1016/j.jhsa.2014.06.005>

8. Anexos.

8.1. Anexo 1.



HOJA DE INFORMACIÓN AL PARTICIPANTE

Nombre del estudio: Efectos y adaptaciones del entrenamiento de fuerza de baja intensidad en combinación con la técnica BFR en escaladores sanos.

Investigador principal de contacto: Salvador Gómez Serna. Doble graduado en Ciencias de la Actividad Física y del Deporte + Fisioterapia.

Responsable del tratamiento de los datos: Universidad Europea de Madrid.

INTRODUCCIÓN

Nos dirigimos a usted para informarle acerca del estudio de investigación en el que usted está invitado a participar. El presente documento tiene la finalidad de que usted obtenga la información necesaria acerca de los procedimientos que van a desarrollarse en el transcurso del estudio, para que usted tenga la posibilidad de aceptar o rechazar libremente su participación en él. Este estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de la Universidad Europea de Madrid. A continuación, se exponen los detalles del proyecto, y el equipo investigador se encuentra a su disposición para responder cualquier tipo de duda que pueda surgirle respecto al desarrollo de la investigación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno. El tratamiento de sus datos para el desarrollo del proyecto será anónimo.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA Y RETIRADA DEL ESTUDIO

Su participación en el estudio es de carácter voluntario, por lo que puede decidir si desea o no participar en él. Además, si así lo desea, puede decidir retirarse del mismo en el momento que considere oportuno. Si esto ocurriese, sus datos serían borrados de todos los archivos que formen parte de la investigación.

DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

La técnica "Blood flow restriction" (BFR) se basa en aplicar una presión externa en las extremidades corporales con la intención de restringir el flujo sanguíneo que llega a éstas. Su uso ha sido empleado en combinación con diferentes tipos de actividad física: entrenamiento de fuerza, entrenamiento aeróbico e inactividad muscular. El objetivo de su empleo radica en las adaptaciones que genera, en lo referente al aumento de fuerza y masa muscular de los individuos. El presente estudio busca comparar los efectos producidos tras



un programa de fuerza de baja intensidad cuando éste se realiza con o sin la aplicación de la restricción vascular, siendo de relevancia su desarrollo en escaladores sanos. Los estudios actuales confirman la seguridad de la técnica siguiendo los protocolos adecuados, en los cuáles se fundamentará el desarrollo de las intervenciones de este estudio.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

Comprobar si existen diferencias en los efectos y adaptaciones producidos tras un protocolo de entrenamiento de fuerza de baja intensidad combinado con BFR frente al mismo protocolo sin aplicación de BFR, en los dedos de la mano y el antebrazo de escaladores sin patología.

8.2. Anexo 2.



CONSENTIMIENTO INFORMADO

“EFECTOS Y ADAPTACIONES DEL ENTRENAMIENTO DE FUERZA DE BAJA INTENSIDAD EN COMBINACIÓN CON LA TÉCNICA BFR EN ESCALADORES SANOS”

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Yo, _____, con DNI _____ y domicilio en _____, a día ___ de ____ del 20__, confirmo haber leído la hoja de información al participante que se me ha facilitado por parte del equipo investigador con información necesaria sobre el estudio que se va a desarrollar, así como haber sido respondido a todas las posibles preguntas que he presentado en relación con el proyecto. Asimismo, soy consciente del carácter voluntario de mi participación en él, del carácter anónimo que tendrá el tratamiento de mis datos y la posibilidad de retirarme del proyecto en cualquier momento de éste sin necesidad de justificar mi decisión.

- Al firmar este documento doy consentimiento para mi participación en el estudio:

Nombre, apellidos y firma del participante:

Nombre, apellidos y firma del investigador principal:

En caso de que el participante sea menor de edad:

Yo, _____, con DNI _____ y domicilio en _____, a día ___ de ____ del 20__, tutor/a legal de _____ confirmo haber leído la hoja de información al participante que se me ha facilitado por parte del equipo investigador con información



necesaria sobre el estudio que se va a desarrollar, así como haber sido respondido a todas las posibles preguntas que he presentado en relación con el proyecto. Asimismo, soy consciente del carácter voluntario de mi participación en él, del carácter anónimo que tendrá el tratamiento de mis datos y la posibilidad de retirarme del proyecto en cualquier momento de éste sin necesidad de justificar mi decisión.

- Al firmar este documento doy consentimiento para mi participación en el estudio de mi hijo/a:

Nombre, apellidos y firma del/la tutor/a del participante:

Nombre, apellidos y firma del investigador principal:

RETIRADA DEL ESTUDIO

Yo, _____, con DNI _____ y domicilio en _____, a día ___ de _____ del 20___, tutor/a legal de _____ (en caso de que el participante sea menor de edad), deseo retirar el consentimiento informado firmado previamente, y con ello retirarme del estudio en el que participaba de manera voluntaria. Para que así conste a los efectos oportunos:

Nombre, apellidos y firma del participante o tutor/a legal del participante:

Nombre, apellidos y firma del investigador principal:

8.3. Anexo 3.

invitrogen

PRODUCT INFORMATION SHEET

Human VEGF ELISA Kit

Catalog Number KHG0111 (96 tests), KHG0112 (2 × 96 tests)

Pub. No. MAN0003960 Rev. 7.0 (33)

CAUTION! This kit contains materials with small quantities of sodium azide. Sodium azide reacts with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. Upon disposal, flush drains with a large volume of water to prevent azide accumulation. Avoid ingestion and contact with eyes, skin and mucous membranes. In case of contact, rinse affected area with plenty of water. Observe all federal, state, and local regulations for disposal.

Note: For safety and biohazard guidelines, see the "Safety" appendix in the *ELISA Technical Guide* (Pub. no. MAN0006706). Read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves.

Product description

The Invitrogen™ Human VEGF ELISA Kit is a solid-phase sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). This assay is designed to detect and quantify the level of human VEGF in human serum, plasma, buffered solution, or cell culture medium. The assay recognizes both natural and recombinant human VEGF.

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), originally named vascular permeability factor (VPF), is an important regulator of angiogenesis and vasculogenesis. Six identified isoforms of 121, 145, 165, 183, 189, and 206 amino acids are derived from alternative splicing in humans. These variants differ with respect to two independent heparin binding domains, and the isoforms exhibit altered affinity for interaction with heparan-sulfate proteoglycans.

Contents and storage

Upon receipt, store the kit at 2°C to 8°C.

Contents	Cat. No. KHG0111 (96 tests)
Hu VEGF Standard, lyophilized; contains 0.1% sodium azide.	2 vials
Standard Diluent Buffer; contains 0.1% sodium azide	25 mL
Incubation Buffer	12 mL
Antibody Coated Plate, 96-well plate	1 plate
Hu VEGF Biotin Conjugate; contains 0.1% sodium azide	11 mL
Streptavidin-HRP (100X)	0.15 mL
Streptavidin HRP Diluent; contains 3.3 mM thymol	25 mL
Wash Buffer Concentrate (25X)	100 mL
Stabilized Chromogen, Tetramethylbenzidine (TMB)	25 mL
Stop Solution	25 mL
Adhesive Plate Covers	3

Materials required but not supplied

- Distilled or deionized water
- Calibrated adjustable precision pipettes and glass or plastic tubes for diluting solutions; beakers, flask and cylinders for preparation of reagents
- Microtiter plate reader with software capable of measurement at or near 450 nm
- Plate washer—automated or manual (squirr bottle, manifold dispenser, or equivalent)

Before you begin

IMPORTANT! Reagents are lot-specific. Do not mix or interchange different reagent lots from various kit lots.

- Review the **Procedural guidelines** and **Plate washing directions** in the *ELISA Technical Guide* available at thermofisher.com.
- Allow reagents to reach room temperature before use. Mix to redissolve any precipitated salts.

Prepare 1X Wash Buffer

1. Dilute 16 mL of Wash Buffer Concentrate (25X) with 384 mL of deionized or distilled water. Label as 1X Wash Buffer.
2. Store the concentrate and 1X Wash Buffer in the refrigerator. Use the diluted buffer within 14 days.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Sample preparation guidelines

- Refer to the *ELISA Technical Guide* at thermofisher.com for detailed sample preparation procedures.
- Collect samples in pyrogen/endotoxin-free tubes.
- Freeze samples after collection if samples will not be tested immediately. Avoid multiple freeze-thaw cycles of frozen samples. Thaw completely and mix well (do not vortex) prior to analysis.
- Avoid the use of hemolyzed or lipemic sera. If large amounts of particulate matter are present in the sample, centrifuge or filter sample prior to analysis.

Pre-dilute samples

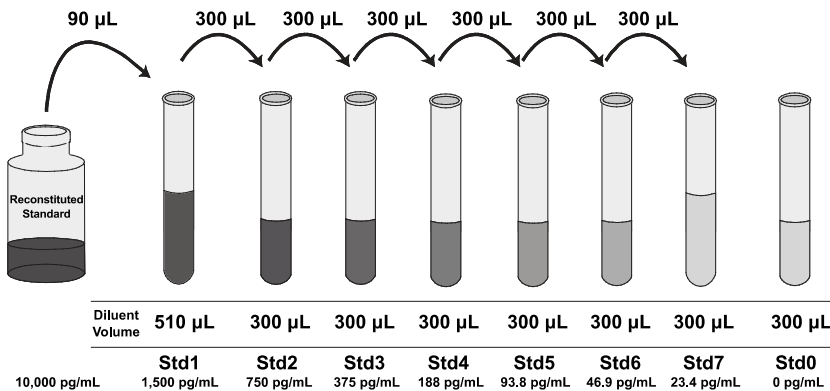
Sample concentrations should be within the range of the standard curve. Because conditions may vary, each investigator should determine the optimal dilution for each application.

- Perform sample dilutions with Standard Diluent Buffer.

Dilute standards

Note: Use glass or plastic tubes for diluting standards.

1. Reconstitute Hu VEGF Standard to 10,000 pg/mL with Standard Diluent Buffer. Refer to the standard vial label for instructions. Swirl or mix gently and allow the contents to sit for 10 minutes to ensure complete reconstitution. Label as 10,000 pg/mL human VEGF. Use the standard within 1 hour of reconstitution.
2. Add 90 µL Reconstituted Standard to one tube containing 510 µL Standard Diluent Buffer and mix. Label as 1,500 pg/mL human VEGF.
3. Add 300 µL Standard Diluent Buffer to each of 7 tubes labeled as follows: 750, 375, 188, 93.8, 46.9, 23.4, and 0 pg/mL human VEGF.
4. Make serial dilutions of the standard as shown in the following dilution diagram. Mix thoroughly between steps.
5. Discard any remaining reconstituted standard. Return the Standard Diluent Buffer to the refrigerator.



Prepare 1X Streptavidin-HRP solution

Note: Prepare 1X Streptavidin-HRP within 15 minutes of usage.






1. For each 8-well strip used in the assay, pipet 10 µL Streptavidin-HRP (100X) solution, and dispense the solution into a tube containing 1 mL of 1X Streptavidin-HRP Diluent. Mix thoroughly.
2. Return the unused Streptavidin-HRP (100X) solution to the refrigerator.

Perform ELISA (Total assay time: 4 hours)

IMPORTANT! Perform a standard curve with each assay.

- Allow all components to reach room temperature before use. Mix all liquid reagents prior to use.
- Determine the number of 8-well strips required for the assay. Insert the strips in the frames for use. Re-bag any unused strips and frames, and store at 2°C to 8°C for future use.



1	Bind antigen 	<p>1.1. Add 50 µL of the Incubation Buffer to all wells except the chromogen blanks.</p> <p>1.2. Add 100 µL of standards to the appropriate wells. For samples and controls, add 50 µL of Standard Diluent Buffer followed by 50 µL of sample (see "Pre-dilute samples" on page 2) to the appropriate wells. Leave the wells for chromogen blanks empty.</p> <p>1.3. Tap the side of the plate to mix. Cover the plate with a plate cover and incubate for 2 hours at room temperature.</p> <p>1.4. Thoroughly aspirate the solution and wash wells 4 times with 1X Wash Buffer.</p>
2	Add Biotin Conjugate 	<p>2.1. Add 100 µL Hu VEGF Biotin Conjugate solution into each well except the chromogen blanks.</p> <p>2.2. Cover the plate with plate cover and incubate for 1 hour at room temperature.</p> <p>2.3. Thoroughly aspirate the solution and wash wells 4 times with 1X Wash Buffer.</p>
3	Add Streptavidin-HRP 	<p>3.1. Add 100 µL 1X Streptavidin-HRP solution (see page 2) into each well except the chromogen blanks.</p> <p>3.2. Cover the plate with a plate cover and incubate for 30 minutes at room temperature.</p> <p>3.3. Thoroughly aspirate the solution from the wells and wash wells 4 times with 1X Wash Buffer.</p>
4	Add Stabilized Chromogen 	<p>4.1. Add 100 µL Stabilized Chromogen to each well. The substrate solution begins to turn blue.</p> <p>4.2. Incubate for 30 minutes at room temperature in the dark.</p> <p>Note: TMB should not touch aluminum foil or other metals.</p>
5	Add Stop Solution 	Add 100 µL Stop Solution to each well. Tap the side of the plate to mix. The solution in the wells changes from blue to yellow.

Read the plate and generate the standard curve

1. Read the absorbance at 450 nm. Read the plate within 2 hours after adding the Stop Solution.
 2. Use curve-fitting software to generate the standard curve. A 4 parameter algorithm provides the best standard curve fit. Optimally, the background absorbance may be subtracted from all data points, including standards, unknowns and controls, prior to plotting.
 3. Read the concentrations for unknown samples and controls from the standard curve. Multiply value(s) obtained for sample(s) by the appropriate factor to correct for the sample dilution.
- Note:** Dilute samples producing signals greater than the upper limit of the standard curve in Standard Diluent Buffer and reanalyze. Multiply the concentration by the appropriate dilution factor.

Performance characteristics

Standard curve example

The following data were obtained for the various standards over the range of 0 to 1,500 pg/mL human VEGF.

Standard Human VEGF (pg/mL)	Optical Density (450 nm)
1,500	2.63
750	1.62
375	0.86
188	0.48
93.8	0.25
46.9	0.15
23.4	0.11
0	0.06

Inter-assay precision

Samples were assayed 42 times in multiple assays to determine precision between assays.

Parameters	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean (pg/mL)	88.6	319	984
Standard Deviation	8.2	27.1	64.4
% Coefficient of Variation	9.3	8.5	6.5

Intra-assay precision

Samples with known human VEGF concentration were assayed in replicates of 14 to determine precision within an assay.

Parameters	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean (pg/mL)	87.4	345	938
Standard Deviation	4.8	12.7	45.8
% Coefficient of Variation	5.5	3.7	4.9

Linearity of dilution

Human serum and tissue culture medium containing 10% fetal bovine serum were spiked with human VEGF and serially diluted in Standard Diluent Buffer over the range of the assay. Linear regression analysis of samples versus the expected concentration yielded a correlation coefficient of 0.99 in both cases.

Dilution	Serum			Cell Lysate		
	Measured (pg/mL)	Expected (pg/mL)	%	Measured (pg/mL)	Expected (pg/mL)	%
Neat	1,834	—	—	1497	—	—
1/2	893	917	97	745	749	99
1/4	493	459	107	386	374	103
1/8	245	229	107	196	187	105
1/16	118	115	103	93	94	99
1/32	58	57	102	47	47	100

Cross-reactivity

Mouse and rat VEGF₁₆₅ showed 0.25% and 0.11% cross-reactivity, respectively. Human VEGF₁₂₁ showed 100% cross-reactivity and complete parallelism with human VEGF₁₆₅.

Expected values

Human bronchial smooth muscle cells were cultured for 144 hours with and without Hu TNF-α (10 ng/mL). The values were 790 pg/mL and 630 pg/mL, respectively.

Fifteen fresh matched sera from healthy individuals were evaluated in this assay. The values for sera ranged from 40–600 pg/mL (mean 270 pg/mL).

Thirteen previously frozen citrate plasma samples were evaluated in this assay. All samples fell below the sensitivity of the assay

Recovery

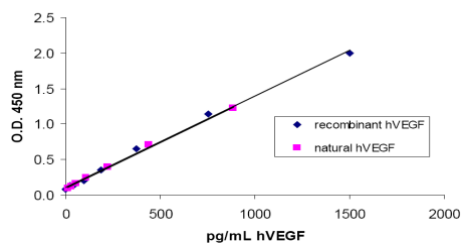
The following table shows the average recovery when adding human VEGF to the listed sample types.

Sample	Average % Recovery
Serum	95
Citrate plasma	99
Culture medium containing 1% fetal bovine serum	90
Culture medium containing 10% fetal bovine serum	88

Parallelism

Natural human VEGF was serially diluted in Standard Diluent Buffer. The optical density of each dilution was plotted against the standard curve. The standard accurately reflects natural human VEGF content in samples.

Parallelism between recombinant and natural hVEGF



Sensitivity

The analytical sensitivity of the assay is <5 pg/mL human VEGF. This was determined by adding two standard deviations to the mean O.D. obtained when the zero standard was assayed 30 times.

Specificity


Buffered solutions of a panel of substances at 10,000 pg/mL were assayed with the Human VEGF ELISA Kit. The following substances were tested and found to have no cross-reactivity: **human** IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-15, EGF, FGF basic, FGF acidic, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, RANTES, SCF, TGF-α, and TNF-α; **mouse** IL-1β, IL-6, IL-10, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, and TNF-α; **rat** IL-1β, IL-6, IL-10, GM-CSF, IFN-γ, and TNF-α.

Limited product warranty

Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) warrant their products as set forth in the Life Technologies' General Terms and Conditions of Sale at www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html. If you have any questions, please contact Life Technologies at www.thermofisher.com/support.

Product label explanation of symbols and warnings

 REF	Catalog Number	 LOT	Batch code		Temperature limitation		Use by		Manufacturer		Consult instructions for use		Caution, consult accompanying documents
---	----------------	---	------------	---	------------------------	---	--------	---	--------------	---	------------------------------	---	---

 Bender MedSystems GmbH | Campus Vienna Biocenter 2 | 1030 Vienna, Austria
For descriptions of symbols on product labels or product documents, go to thermofisher.com/symbols-definition.

The information in this guide is subject to change without notice.

DISCLAIMER: TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. AND/OR ITS AFFILIATE(S) WILL NOT BE LIABLE FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING YOUR USE OF IT.

Important Licensing Information: These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses. By use of these products, you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

©2021 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

thermofisher.com/support | thermofisher.com/askaquestion
thermofisher.com

2 April 2021

ThermoFisher
SCIENTIFIC

8.4. Anexo 4.

invitrogen
PRODUCT INFORMATION SHEET

HIF-1A ELISA Kit

EHIF1A EHIF1A2 EHIF1A5

Number	Description
EHIF1A	HIF-1A ELISA Kit, sufficient reagents for 96 determinations
EHIF1A2	HIF-1A ELISA Kit, sufficient reagents for 2 × 96 determinations
EHIF1A5	HIF-1A ELISA Kit, sufficient reagents for 5 × 96 determinations

Kit Contents	EHIF1A	EHIF1A2	EHIF1A5
Antibody Coated Plate, 96-well plate	1 each	2 each	5 each
Lyophilized Recombinant HIF-1A Standard	2 vials	4 vials	10 vials
Standard Diluent	14mL	2 × 14mL	5 × 14mL
30X Wash Buffer	50mL	2 × 50mL	5 × 50mL
Biotinylated Antibody Reagent	12mL	2 × 12mL	5 × 12mL
Streptavidin-HRP Concentrate	75µL	2 × 75µL	5 × 75µL
HRP Dilution Buffer	14mL	2 × 14mL	5 × 14mL
TMB Substrate	13mL	2 × 13mL	5 × 13mL
Stop Solution, contains 0.16M sulfuric acid	13mL	2 × 13mL	5 × 13mL
Adhesive Plate Covers	6 each	12 each	30 each

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

Storage: Upon receipt store at 2-8°C.

Table of Contents

Introduction	2
Procedure Summary	2
Additional Materials Required.....	2
Precautions.....	3
Sample Preparation.....	3
Reagent Preparation.....	4
Assay Procedure	5
Performance Characteristics	6

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.
 MAN0014317 Rev 2.01 (30) Effective Date: 02 Aug 2017
 Manufacturing site: Bender MedSystems GmbH | Campus Vienna Biocenter 2 | 1030 Vienna, Austria

ThermoFisher
 SCIENTIFIC












www.thermofisher.com

Introduction

The Invitrogen™ HIF-1 Alpha ELISA Kit measures human hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF1A) protein in serum, plasma and cell culture lysates using the quantitative sandwich ELISA method. HIF1A standards and samples are captured by a polyclonal HIF1A antibody on the precoated plate and detected using a biotinylated monoclonal HIF1A antibody reactive to epitopes other than the capture antibody. The biotinylated detection antibody is then bound to streptavidin-HRP, which catalyzes the conversion of TMB to a colored derivative. Color development is linear for the assay's dynamic range and directly proportional to the amount of HIF1A present in the sample.

The HIF1A protein is the 92kDa alpha subunit of transcription factor hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), which is a heterodimer composed of an alpha and a beta subunit. HIF-1 functions as a master regulator of cellular and systemic homeostatic response to hypoxia by activating transcription of many genes, including those involved in energy metabolism, angiogenesis, apoptosis, and other genes whose protein products increase oxygen delivery or facilitate metabolic adaptation to hypoxia. HIF-1 thus plays an essential role in embryonic vascularization, tumor angiogenesis and pathophysiology of ischemic disease. Activation requires recruitment of transcriptional co-activators such as CREBBP and EP300. Activity is enhanced by interaction with either NCOA1 or NCOA2. Interaction with redox regulatory protein APEX seems to activate CTAD and potentiates activation by NCOA1 and CREBBP. The HIF-1 heterodimer binds to core DNA sequence 5'-[AG]CGTG-3' within the hypoxia response element (HRE) of target gene promoters.

Procedure Summary

- | | | | |
|--|--|--|--|
| 
1. Add 50µL of Standards or samples to each well. | 
2. Cover plate. Incubate at room temperature (20-25°C) for 2 hours on a plate shaker. | 
3. Wash plate THREE times. Add 50µL of Biotinylated detection antibody. | 
4. Cover plate. Incubate at room temperature (20-25°C) for 1 hour on a plate shaker. |
| 
5. Wash plate THREE times. Add 50µL of prepared Streptavidin-HRP to each well. | 
6. Cover plate. Incubate at room temperature (20-25°C) for 30 minutes on a plate shaker. | 
7. Wash plate THREE times. Add 100µL of TMB substrate. | 
8. Develop plate in the dark at room temperature for 30 minutes. |
| 
9. Stop the reaction by adding 100µL of Stop Solution to each well. | 
10. Measure absorbance on a plate reader at 450nm minus 550nm. | 
11. Calculate results using graph paper or curve-fitting statistical software. | |

Additional Materials Required

- Precision pipettors with disposable plastic tips to deliver 5-1000µL and plastic pipettes to deliver 5-15mL
- Glass or plastic 2L container to prepare Wash Buffer
- Squirt wash bottle or an automated 96-well plate washer
- 1.5mL polypropylene or polyethylene tubes to prepare standards – do not use polystyrene, polycarbonate or glass tubes
- Disposable reagent reservoirs (Product No. 15075)
- Microcentrifuge
- 15mL plastic tube to prepare Streptavidin-HRP Solution

2

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

MAN0014317 Rev 2.01 (30) Effective Date: 02 Aug 2017

Manufacturing site: Bender MedSystems GmbH | Campus Vienna Biocenter 2 | 1030 Vienna, Austria

ThermoFisher
SCIENTIFIC

www.thermofisher.com

-
- A standard ELISA reader for measuring absorbance at 450nm and 550nm. If a 550nm filter is not available, the absorbance can be measured at 450nm only. Refer to the instruction manual supplied with the instrument being used.
 - Graph paper or a computerized curve-fitting statistical software package

Precautions

- All samples and reagents must be at room temperature (20-25°C) before use in the ELISA.
- Review all instructions carefully and verify all components against the kit contents list (page 1) before beginning.
- Thaw samples at room temperature. Do not use a water bath to thaw samples.
- When preparing standard curve and sample dilutions in culture medium, use the same medium used to culture the cells. For example, if RPMI with 10% fetal calf serum (FCS) was used to culture cells, then use RPMI with 10% FCS to dilute the standard and samples. Do NOT use RPMI without serum supplement.
- To avoid cross-contamination, always use a new disposable reagent reservoir and new disposable pipette tips for each transfer. Also, use a new adhesive plate cover for each incubation step.
- Once reagents have been added to the plate, take care NOT to let the plate dry at any time during the assay.
- Avoid microbial contamination of reagents.
- Avoid exposing reagents to excessive heat or light during storage and incubation.
- Discard unused ELISA Kit components after assay completion. Do not mix reagents from different kit lots.
- Do not use glass pipettes to measure the TMB Substrate Solution. Do not contaminate the TMB Substrate Solution; if it is blue before use, DO NOT USE THE SOLUTION.
- Individual components can contain antibiotics or preservatives. Wear gloves while performing the assay to avoid contact with samples and reagents. Follow proper disposal procedures.

Sample Preparation

A. Sample Handling

- Serum; EDTA, heparin plasma; and culture lysates may be tested in this ELISA.
- 50µL per well of serum, plasma or culture lysate is required.
- Store samples at 2-8°C and assay within 24 hours. For long-term storage, aliquot and freeze samples at -70°C.
- Avoid repeated freeze-thaw cycles when storing samples.
- Test samples and standards must be assayed in duplicate or triplicate each time the ELISA is performed.
- Mix samples by gently inverting tubes.
- If samples are clotted, grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated, or if there is any question about the integrity of a sample, make a note on the template and interpret the results with caution.

B. Sample Dilution

- If the HIF-1A concentration from the sample will exceed the highest point of the standard curve (i.e., 20,000pg/mL), prepare one or more five-fold dilutions of the test sample. When testing **culture lysates**, prepare the serial dilutions using the culture medium. When testing **serum or plasma**, prepare the serial dilutions using the provided Standard Diluent. For example, a five-fold dilution is prepared by adding 0.1mL (100µL) of test sample to 0.4mL (400µL) of appropriate diluent. Mix samples thoroughly between dilutions before assaying.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.
MAN0014317 Rev 2.01 (30) Effective Date: 02 Aug 2017

Manufacturing site: Bender MedSystems GmbH | Campus Vienna Biocenter 2 | 1030 Vienna, Austria

ThermoFisher
SCIENTIFIC

www.thermofisher.com

Reagent Preparation

For procedural differences when using partial plates, look for **(PP)** throughout these instructions.

Wash Buffer

1. Label a new glass or plastic 2L container “Wash Buffer.” The 30X Wash Buffer may have a cloudy appearance.
2. Add entire contents of the 30X Wash Buffer (50mL) bottle to a 2L container and dilute to a final volume of 1.5L with ultrapure water. Mix thoroughly.

(PP) When using partial plates, store the reconstituted Wash Buffer at 2-8°C.

Note: Wash Buffer must be at room temperature before use in the assay. Do not use Wash Buffer if it becomes visibly contaminated during storage.

Standards

(PP) Reconstitute with Standard Diluent and use one vial of the lyophilized Standard per partial plate.

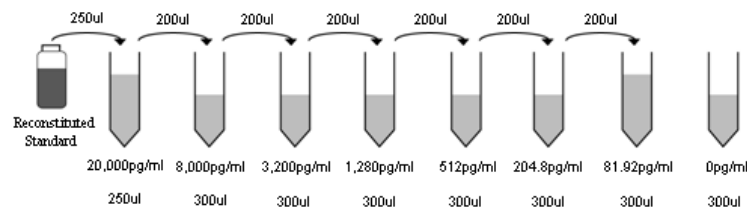
1. Prepare Standards just before use and use within one hour of reconstitution. Do not store reconstituted standards.
2. When testing **culture lysate samples**, reconstitute Standard with Standard Diluent. Reconstitution volume is stated on the Standard vial label. The Standard will dissolve in ~1 minute. Mix by gently inverting vial. Use the sample culture medium to prepare standard curve dilutions.

When testing **serum or plasma samples**, reconstitute Standard with Standard Diluent. Reconstitution volume is stated on the Standard vial label. The Standard will dissolve in ~1 minute. Mix by gently inverting vial. Use the Standard Diluent provided to prepare the standard curve serial dilutions.

When testing **serum, plasma and cell culture lysate samples on the same plate**, validate the media to establish if the same standard curve can be used for the different sample types. Prepare a standard curve (including a zero/blank) using culture medium to reconstitute and dilute the Standard. Use medium containing serum or other protein to maximize stability of the HIF-1A. Perform this curve in parallel with a standard curve reconstituted in Standard Diluent and diluted in the Standard Diluent provided. If the OD values of the two curves are within 10% of the mean for both curves, then the assay can be performed with Standard Diluent, whether you are testing culture lysate, plasma or serum samples.

3. Label eight tubes, one for each standard curve point: 20,000, 8,000, 3,200, 1,280, 512, 204.8, 81.92, and 0pg/mL. Prepare a 1:2 dilution of the reconstituted standard and then 1:2.5 serial dilutions for the remaining standards as follows:
4. Pipette 250µL of appropriate diluent into the first tube (i.e., 20,000pg/ml).
5. Pipette 300µL of appropriate diluent into all of the remaining tubes.
6. Pipette 250µL of the reconstituted standard into the first tube (i.e., 20,000pg/mL) and mix.
7. Pipette 200µL of this dilution into the second tube (i.e., 8,000pg/mL) and mix.
8. Repeat the serial dilutions (using 200µL) five more times to complete the standard curve points. These concentrations, 20,000, 8,000, 3,200, 1,280, 512, 204.8, 81.92, and 0pg/mL are the standard curve.

Serial Dilutions



Assay Procedure

A. Calibrator and Sample Incubation

- **(PP)** Determine the number of strips required. Leave these strips in the plate frame. Tightly seal remaining unused strips in the provided foil pouch with desiccant and store at 2-8°C. After completing the assay, retain the plate frame for second partial plate. When using the second partial plate, place strips securely in the plate frame.
 - Use the Plate Template provided to record the locations of the zero standard (blank or negative control), HIF-1A standards and samples. Perform seven standard points and one blank in duplicate with each series of unknown samples.
 - If using a multichannel pipettor, use a new reagent reservoir to add the Biotinylated Antibody Reagent. Remove from the vial only the amount required for the number of strips being used.
1. Add 50µL of diluted standards and test samples to each well. Mix well by gently tapping the plate several times.
 2. Carefully cover the plate with an adhesive plate cover. Ensure all edges and strips are tightly sealed by running your thumb over the edges and down each strip. Incubate for 2 hours at room temperature (20-25°C) on a plate shaker.
 3. Carefully remove the adhesive plate cover. Wash plate THREE times with Wash Buffer as described in the Plate Washing Section (Section B).

B. Plate Washing

1. Gently squeeze the long side of the plate frame before washing to ensure all strips securely remain in the frame.
2. Empty plate contents. Use a squirt bottle to vigorously fill each well completely with Wash Buffer, then empty plate contents. Repeat procedure two additional times for a total of THREE washes. Blot plate onto paper towels or other absorbent material.

Note: For automated washing, aspirate all wells and wash THREE times with Wash Buffer, overfilling wells with Wash Buffer. Blot plate onto paper towels or other absorbent material.

C. Biotinylated Antibody Reagent Incubation

1. Add 50µL of Biotinylated Antibody Reagent to each well.
2. Carefully attach a new adhesive plate cover, ensuring all edges and strips are tightly sealed. Incubate the plate for 1 hour at room temperature (20-25°C) on a plate shaker.
3. Carefully remove the adhesive plate cover, discard the plate contents and wash THREE times as described in the
4. Plate Washing Section.

D. Streptavidin-HRP Solution Preparation and Incubation

- Prepare Streptavidin-HRP Solution **just before use**. Do not prepare more solution than required.
 - Do not store the prepared Streptavidin-HRP Solution.
 - Use a 15mL plastic tube to prepare the Streptavidin-HRP Solution.
 - Use a new reagent reservoir and pipette tips when adding the prepared Streptavidin-HRP Solution.
1. Briefly centrifuge the Streptavidin-HRP Concentrate to force entire vial contents to the bottom.
 2. **(PP)** Use only the Streptavidin-HRP Solution amount required for the number of strips being used. For each strip, mix 2.5µL of Streptavidin-HRP Concentrate with 1mL of HRP Dilution Buffer. Store Streptavidin-HRP Concentrate reserved for additional strips at 2-8°C.
 3. For one complete 96-well plate, add 30µL of Streptavidin-HRP Concentrate to 12mL of HRP Dilution Buffer and mix gently.
 4. Add 50µL of prepared Streptavidin-HRP Solution to each well.
 5. Carefully attach a new adhesive plate cover, ensuring all edges and strips are tightly sealed. Incubate the plate for 30 minutes at room temperature (20-25°C) on a plate shaker.
 6. Carefully remove the adhesive plate cover, discard the plate contents and wash THREE times as described in the Plate Washing Section.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

MAN0014317 Rev 2.01 (30) Effective Date: 02 Aug 2017

Manufacturing site: Bender MedSystems GmbH | Campus Vienna Biocenter 2 | 1030 Vienna, Austria

ThermoFisher
SCIENTIFIC

www.thermofisher.com

E. Substrate Incubation and Stop Solution Addition

- Use new disposable reagent reservoirs when adding the TMB Substrate Solution and Stop Solution.
 - From the bottle, dispense ONLY the required amount of 100µL per well for the number of wells being used. Do not use a glass pipette to measure the TMB Substrate Solution.
 - **(PP)** Do not combine leftover substrate with that reserved for the second partial plate. Take care not to contaminate the remaining TMB Substrate.
1. Pipette 100µL of TMB Substrate Solution into each well.
 2. Allow color reaction to develop at room temperature in the dark for 30 minutes. Do not cover plate with aluminum foil or a plate sealer. The substrate reaction yields a blue solution that turns yellow when Stop Solution is added.
 3. After 30 minutes, stop the reaction by adding 100µL of Stop Solution to each well.

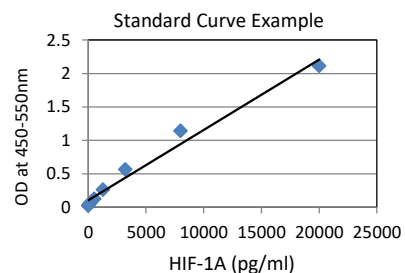
F. Absorbance Measurement

Evaluate the plate within 30 minutes of stopping the reaction. Measure absorbance on an ELISA plate reader set at 450nm and 550nm. Subtract 550nm values from 450nm values to correct for optical imperfections in the microplate. If an absorbance at 550nm is not available, measure the absorbance at 450nm only.

Note: When the 550nm measurement is omitted, absorbance values will be higher.

G. Calculation of Results

- The standard curve is used to determine HIF-1A amount in an unknown sample. Generate the standard curve by plotting the average absorbance obtained for each Standard concentration on the vertical (Y) axis vs. the corresponding HIF-1A concentration (pg/mL) on the horizontal (X) axis.
- Calculate results using graph paper or curve-fitting statistical software. Determine the HIF-1A amount in each sample by interpolating from the absorbance value (Y-axis) to HIF-1A concentration (X- axis) using the standard curve.
- If the test sample was diluted, multiply the interpolated value obtained from the standard curve by the dilution factor to calculate pg/mL of HIF-1A in the sample.
- Absorbance values obtained for duplicates should be within 10% of the mean value. Carefully consider duplicate values that differ from the mean by greater than 10%.



Performance Characteristics

Sensitivity: 30pg/mL

The sensitivity, or Lower Limit of Detection (LLD), was determined by assaying replicates of zero and the standard curve. The mean signal of zero + two standard deviations read in dose from the standard curve is the LLD. This value is the smallest dose that is not zero with 95% confidence.

Assay Range: 81.92 – 20,000pg/mL

Suggested standard curve points are 20,000, 8,000, 3,200, 1,280, 512, 204.8, 81.92, and 0pg/mL

Reproducibility:

Intra-Assay CV: <10%

Inter-Assay CV: <10%

Specificity: This ELISA is specific for the measurement of natural and recombinant human HIF-1A. The kit shows cross reactivity with mouse HIF-1A and is known to cross react with rat HIF-1A.

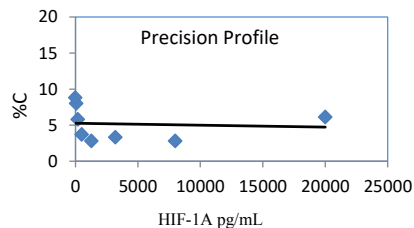
Calibration: The standards in this assay were calibrated to an in-house standard.

Expected Values:

Cell Culture Lysates: NIH 3T3 cells were cultured in DMEM cell culture media with 10% fetal calf serum. Cultured NIH 3T3 cells were hypoxia induced via deferoxamine at a concentration of 100µM. Samples were collected after 24hr proliferation, cells were lysed by trypsinization, and 70pg/mL of HIF-1A was measured.

Precision: The standard curve's average coefficients of variation (CV) are plotted against HIF-1A concentration (pg/mL). The points represent samples evaluated in replicates of two in 10 representative pre-coated plates.

Recovery: Five samples of various matrices type: Human serum, EDTA plasma, and heparin plasma were initially diluted 1:10 with Sample Diluent, spiked with known concentrations of HIF-1A, and assayed to calculate mean % recovery.



Spiked concentration (pg/mL)	Mean % recovery		
	Serum (n=5)	Plasma EDTA (n=5)	Plasma heparin (n=5)
4000	101	93	89
2000	103	88	89
1000	88	87	92

Dilution Linearity: Five individual donor samples for each sample type: Human serum, EDTA plasma and heparin plasma were initially diluted 1:10 with Sample Diluent and spiked with a high concentration of HIF-1A. Samples were further serially diluted with appropriate Sample Diluent and assayed.

Dilution factor	Mean % recovery		
	Serum (n=5)	Plasma EDTA (n=5)	Plasma heparin (n=5)
1:2	104	103	98
1:4	105	93	95
1:8	110	88	90

Limited product warranty

Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) warrant their products as set forth in the Life Technologies' General Terms and Conditions of Sale found on Life Technologies' website at www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html. If you have any questions, please contact Life Technologies at www.thermofisher.com/support.

Product label explanation of symbols and warnings

REF	Catalog Number	LOT	Batch code	Temperature limitation	Use by	Manufacturer	Consult instructions for use	Caution, consult accompanying documents
-----	----------------	-----	------------	------------------------	--------	--------------	------------------------------	---

Manufacturer's address: Bender MedSystems GmbH | Campus Vienna Biocenter 2 | 1030 Vienna, Austria
 The information in this guide is subject to change without notice.
 DISCLAIMER: TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, LIFE TECHNOLOGIES AND/OR ITS AFFILIATE(S) WILL NOT BE LIABLE FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING YOUR USE OF IT.
Important Licensing Information: These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses. By use of these products, you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.
 ©2017 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

MAN0014317 Rev 2.01 (30) Effective Date: 02 Aug 2017

Manufacturing site: Bender MedSystems GmbH | Campus Vienna Biocenter 2 | 1030 Vienna, Austria

ThermoFisher
SCIENTIFIC

www.thermofisher.com

Plate Templates

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

8.5. Anexo 5.

Version 2 Last updated 18 November 2021

**ab253217
Human iNOS
SimpleStep ELISA® Kit**

For the quantitative measurement of iNOS in human cell extract samples.

This product is for research use only and is not intended for diagnostic use.

Copyright © 2021 Abcam. All rights reserved

Table of Contents

1. Overview	1
2. Protocol Summary	2
3. Precautions	3
4. Storage and Stability	3
5. Limitations	4
6. Materials Supplied	4
7. Materials Required, Not Supplied	5
8. Technical Hints	5
9. Reagent Preparation	7
10. Standard Preparation	8
11. Sample Preparation	9
12. Plate Preparation	10
13. Assay Procedure	11
14. Calculations	13
15. Typical Data	14
16. Typical Sample Values	15
17. Assay Specificity	18
18. Species Reactivity	19
19. Troubleshooting	20
20. Notes	21
Technical Support	22

Copyright © 2021 Abcam. All rights reserved

1. Overview

iNOS in vitro SimpleStep ELISA® (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) kit is designed for the quantitative measurement of iNOS protein in human cell extract samples.

The SimpleStep ELISA® employs an affinity tag labeled capture antibody and a reporter conjugated detector antibody which immunocapture the sample analyte in solution. This entire complex (capture antibody/analyte/detector antibody) is in turn immobilized via immunoaffinity of an anti-tag antibody coating the well. To perform the assay, samples or standards are added to the wells, followed by the antibody mix. After incubation, the wells are washed to remove unbound material. TMB Development Solution is added and during incubation is catalyzed by HRP, generating blue coloration. This reaction is then stopped by addition of Stop Solution completing any color change from blue to yellow. Signal is generated proportionally to the amount of bound analyte and the intensity is measured at 450 nm. Optionally, instead of the endpoint reading, development of TMB can be recorded kinetically at 600 nm.

iNOS, also known as NOS2, catalyzes the production of nitric oxide from L-arginine, which is used in various cell signaling events. iNOS is an inducible member of the NOS family and is upregulated as a host-defense mechanism during proinflammatory cytokine activity seen with tumorigenesis and parasitic infection. iNOS activity is a key cause of septic shock.

ab253217 Human iNOS SimpleStep ELISA Kit 1

2. Protocol Summary

Prepare all reagents, samples, and standards as instructed

↓

Add 50 µL standard or sample to appropriate wells

↓

Add 50 µL Antibody Cocktail to all wells

↓

Incubate at room temperature for 1 hour

↓

Aspirate and wash each well three times with 350 µL 1X Wash Buffer PT

↓

Add 100 µL TMB Development Solution to each well and incubate for 10 minutes.

↓

Add 100 µL Stop Solution and read OD at 450 nm

ab253217 Human iNOS SimpleStep ELISA Kit 2

3. Precautions

Please read these instructions carefully prior to beginning the assay.

- All kit components have been formulated and quality control tested to function successfully as a kit.
- We understand that, occasionally, experimental protocols might need to be modified to meet unique experimental circumstances. However, we cannot guarantee the performance of the product outside the conditions detailed in this protocol booklet.
- Reagents should be treated as possible mutagens and should be handled with care and disposed of properly. Please review the Safety Datasheet (SDS) provided with the product for information on the specific components.
- Observe good laboratory practices. Gloves, lab coat, and protective eyewear should always be worn. Never pipet by mouth. Do not eat, drink or smoke in the laboratory areas.
- All biological materials should be treated as potentially hazardous and handled as such. They should be disposed of in accordance with established safety procedures.

4. Storage and Stability

Store kit at +4°C immediately upon receipt. Kit has a storage time of 1 year from receipt, providing components have not been reconstituted.

Refer to list of materials supplied for storage conditions of individual components.

ab253217 Human iNOS SimpleStep ELISA Kit

3

5. Limitations

- Assay kit intended for research use only. Not for use in diagnostic procedures.
- Do not mix or substitute reagents or materials from other kit lots or vendors. Kits are QC tested as a set of components and performance cannot be guaranteed if utilized separately or substituted.

6. Materials Supplied

Item	Quantity	Storage Condition
Human iNOS Capture Antibody 10X	600 µL	+4°C
Human iNOS Detector Antibody 10X	600 µL	+4°C
Human iNOS Lyophilized Recombinant Protein	2 Vials	+4°C
Antibody Diluent CPI	6 mL	+4°C
Cell Extraction Buffer PTR 5X	10 mL	+4°C
Cell Extraction Enhancer Solution 50X	1 mL	+4°C
Sample Diluent NS	12 mL	+4°C
Wash Buffer PT 10X	20 mL	+4°C
TMB Development Solution	12 mL	+4°C
Stop Solution	12 mL	+4°C
SimpleStep Pre-Coated 96-Well Microplate	96 Wells	+4°C
Plate Seal	1	+4°C

ab253217 Human iNOS SimpleStep ELISA Kit

4

7. Materials Required, Not Supplied

These materials are not included in the kit, but will be required to successfully perform this assay:

- Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 or 600 nm.
- Method for determining protein concentration (BCA assay recommended).
- Deionized water.
- Multi- and single-channel pipettes.
- Tubes for standard dilution.
- Plate shaker for all incubation steps.
- Optional: Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF) (or other protease inhibitors).

8. Technical Hints

- Samples generating values higher than the highest standard should be further diluted in the appropriate sample dilution buffers.
- Avoid foaming or bubbles when mixing or reconstituting components.
- Avoid cross contamination of samples or reagents by changing tips between sample, standard and reagent additions.
- Ensure plates are properly sealed or covered during incubation steps.
- Complete removal of all solutions and buffers during wash steps is necessary to minimize background.
- As a guide, typical ranges of sample concentration for commonly used sample types are shown below in Sample Preparation (section 11).
- All samples should be mixed thoroughly and gently.
- Avoid multiple freeze/thaw of samples.
- Incubate ELISA plates on a plate shaker during all incubation steps.
- When generating positive control samples, it is advisable to change pipette tips after each step.

ab253217 Human iNOS SimpleStep ELISA Kit

5

- The provided Cell Extraction Enhancer Solution 50X may precipitate when stored at +4°C. To dissolve, warm briefly at +37°C and mix gently. The Cell Extraction Enhancer Solution 50X can be stored at room temperature to avoid precipitation.
- To avoid high background always add samples or standards to the well before the addition of the antibody cocktail.
- This kit is sold based on number of tests. A 'test' simply refers to a single assay well. The number of wells that contain sample, control or standard will vary by product. Review the protocol completely to confirm this kit meets your requirements. Please contact our Technical Support staff with any questions.

ab253217 Human iNOS SimpleStep ELISA Kit

6

9. Reagent Preparation

- Equilibrate all reagents to room temperature (18-25°C) prior to use. The kit contains enough reagents for 96 wells. The sample volumes below are sufficient for 48 wells (6 x 8-well strips); adjust volumes as needed for the number of strips in your experiment.
 - Prepare only as much reagent as is needed on the day of the experiment. Capture and Detector Antibodies have only been tested for stability in the provided 10X formulations.
- 9.1 1X Cell Extraction Buffer PTR (For cell and tissue extracts only): Prepare 1X Cell Extraction Buffer PTR by diluting Cell Extraction Buffer PTR 5X and 50X Cell Extraction Enhancer Solution to 1X with deionized water. To make 10 mL 1X Cell Extraction Buffer PTR combine 7.8 mL deionized water, 2 mL Cell Extraction Buffer PTR 5X and 200 µL Cell Extraction Enhancer Solution 50X. Mix thoroughly and gently. If required protease inhibitors can be added.
Alternative – Enhancer may be added to 1X Cell Extraction Buffer PTR after extraction of cells or tissue. Refer to note in the Troubleshooting section.
- 9.2 1X Wash Buffer PT: Prepare 1X Wash Buffer PT by diluting Wash Buffer PT 10X with deionized water. To make 50 mL 1X Wash Buffer PT combine 5 mL Wash Buffer PT 10X with 45 mL deionized water. Mix thoroughly and gently.
- 9.3 Antibody Cocktail: Prepare Antibody Cocktail by diluting the capture and detector antibodies in Antibody Diluent CPI. To make 3 mL of the Antibody Cocktail combine 300 µL 10X Capture Antibody and 300 µL 10X Detector Antibody with 2.4 mL Antibody Diluent CPI. Mix thoroughly and gently.

ab253217 Human iNOS SimpleStep ELISA Kit

7

10. Standard Preparation

- Always prepare a fresh set of standards for every use.
 - Discard working standard dilutions after use as they do not store well.
 - The following section describes the preparation of a standard curve for duplicate measurements (recommended).
- 10.1 IMPORTANT: If the protein standard vial has a volume identified on the label, reconstitute the iNOS by adding that volume of 1X Cell Extraction Buffer PTR indicated on the label. Alternatively, if the vial has a mass identified, reconstitute the iNOS standard by adding 500 µL 1X Cell Extraction Buffer PTR. Hold at room temperature for 10 minutes and mix gently. This is the 60,000 pg/mL Stock Standard Solution.
- 10.1.1 Label eight tubes, Standards 1–8.
- 10.1.2 Add 380 µL 1X Cell Extraction Buffer PTR into tube number 1 and 150 µL of 1X Cell Extraction Buffer PTR into numbers 2-8.
- 10.1.3 Use the Stock Standard to prepare the following dilution series. Standard #8 contains no protein and is the Blank control:



ab253217 Human iNOS SimpleStep ELISA Kit

8

11. Sample Preparation

Typical Sample Dynamic Range	
Sample Type	Range
Caco-2 Cell Extract	200 – 800 µg/mL

- 11.1 Preparation of extracts from cell pellets:
- 11.1.1 Collect non-adherent cells by centrifugation or scrape to collect adherent cells from the culture flask. Typical centrifugation conditions for cells are 500 x g for 5 minutes at 4°C.
- 11.1.2 Rinse cells twice with PBS.
- 11.1.3 Solubilize pellet at 2x10⁷ cell/mL in chilled 1X Cell Extraction Buffer PTR.
- 11.1.4 Incubate on ice for 20 minutes.
- 11.1.5 Centrifuge at 18,000 x g for 20 minutes at 4°C.
- 11.1.6 Transfer the supernatants into clean tubes and discard the pellets.
- 11.1.7 Assay samples immediately or aliquot and store at -80°C. The sample protein concentration in the extract may be quantified using a protein assay.
- 11.1.8 Dilute samples to desired concentration in 1X Cell Extraction Buffer PTR.
- 11.2 Preparation of extracts from adherent cells by direct lysis (alternative protocol):
- 11.2.1 Remove growth media and rinse adherent cells 2 times in PBS.
- 11.2.2 Solubilize the cells by addition of chilled 1X Cell Extraction Buffer PTR directly to the plate (use 750 µL - 1.5 mL 1X Cell Extraction Buffer PTR per confluent 15 cm diameter plate).
- 11.2.3 Scrape the cells into a microfuge tube and incubate the lysate on ice for 15 minutes.
- 11.2.4 Centrifuge at 18,000 x g for 20 minutes at 4°C.
- 11.2.5 Transfer the supernatants into clean tubes and discard the pellets.
- 11.2.6 Assay samples immediately or aliquot and store at -80°C. The sample protein concentration in the extract may be quantified using a protein assay.
- 11.2.7 Dilute samples to desired concentration in 1X Cell Extraction Buffer PTR.

ab253217 Human iNOS SimpleStep ELISA Kit

9

12. Plate Preparation

- The 96 well plate strips included with this kit are supplied ready to use. It is not necessary to rinse the plate prior to adding reagents.
- Unused plate strips should be immediately returned to the foil pouch containing the desiccant pack, resealed and stored at 4°C.
- For each assay performed, a minimum of two wells must be used as the zero control.
- For statistical reasons, we recommend each sample should be assayed with a minimum of two replicates (duplicates).
- Differences in well absorbance or "edge effects" have not been observed with this assay.

ab253217 Human iNOS SimpleStep ELISA Kit

10

13. Assay Procedure

- Equilibrate all materials and prepared reagents to room temperature prior to use.
 - We recommend that you assay all standards, controls and samples in duplicate.
- 13.1 Prepare all reagents, working standards, and samples as directed in the previous sections.
 - 13.2 Remove excess microplate strips from the plate frame, return them to the foil pouch containing the desiccant pack, reseal and return to 4°C storage.
 - 13.3 Add 50 µL of all sample or standard to appropriate wells.
 - 13.4 Add 50 µL of the Antibody Cocktail to each well.
 - 13.5 Seal the plate and incubate for 1 hour at room temperature on a plate shaker set to 400 rpm.
 - 13.6 Wash each well with 3 x 350 µL 1X Wash Buffer PT. Wash by aspirating or decanting from wells then dispensing 350 µL 1X Wash Buffer PT into each well. Wash Buffer PT should remain in wells for at least 10 seconds. Complete removal of liquid at each step is essential for good performance. After the last wash invert the plate and tap gently against clean paper towels to remove excess liquid.
 - 13.7 Add 100 µL of TMB Development Solution to each well and incubate for 10 minutes in the dark on a plate shaker set to 400 rpm.
Given variability in laboratory environmental conditions, optimal incubation time may vary between 5 and 20 minutes. Note: The addition of Stop Solution will change the color from blue to yellow and enhance the signal intensity about 3X. To avoid signal saturation, proceed to the next step before the high concentration of the standard reaches a blue color of O.D.600 equal to 1.0.
 - 13.8 Add 100 µL of Stop Solution to each well. Shake plate on a plate shaker for 1 minute to mix. Record the OD at 450 nm. This is an endpoint reading.
 - 13.9 Alternative to 13.7 – 13.8: Instead of the endpoint reading at 450 nm, record the development of TMB Substrate kinetically. Immediately after addition of TMB Development Solution begin recording the blue color development with elapsed

ab253217 Human iNOS SimpleStep ELISA Kit

11

time in the microplate reader prepared with the following settings:

Mode	Kinetic
Wavelength:	600 nm
Time:	up to 20 min
Interval:	20 sec - 1 min
Shaking:	Shake between readings

Δ Note: that an endpoint reading can also be recorded at the completion of the kinetic read by adding 100 µL Stop Solution to each well and recording the OD at 450 nm.

13.10 Analyze the data as described below.

ab253217 Human iNOS SimpleStep ELISA Kit

12

14. Calculations

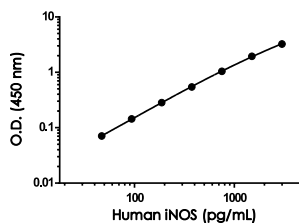
- 14.1 Calculate the average absorbance value for the blank control (zero) standards. Subtract the average blank control standard absorbance value from all other absorbance values.
 - 14.2 Create a standard curve by plotting the average blank control subtracted absorbance value for each standard concentration (y-axis) against the target protein concentration (x-axis) of the standard. Use graphing software to draw the best smooth curve through these points to construct the standard curve.
- Δ Note: Most microplate reader software or graphing software will plot these values and fit a curve to the data. A four-parameter curve fit (4PL) is often the best choice; however, other algorithms (e.g. linear, semi-log, log/log, 4-parameter logistic) can also be tested to determine if it provides a better curve fit to the standard values.
- 14.3 Determine the concentration of the target protein in the sample by interpolating the blank control subtracted absorbance values against the standard curve. Multiply the resulting value by the appropriate sample dilution factor, if used, to obtain the concentration of target protein in the sample.
 - 14.4 Samples generating absorbance values greater than that of the highest standard should be further diluted and reanalyzed. Similarly, samples which measure at an absorbance values less than that of the lowest standard should be retested in a less dilute form.

ab253217 Human iNOS SimpleStep ELISA Kit

13

15. Typical Data

Typical standard curve – data provided for demonstration purposes only. A new standard curve must be generated for each assay performed.



Concentration (pg/mL)	O.D. 450 nm		Mean O.D
	1	2	
0	0.047	0.049	0.048
46.88	0.119	0.119	0.119
93.75	0.192	0.192	0.192
187.50	0.334	0.330	0.332
375	0.591	0.597	0.594
750	1.091	1.098	1.095
1,500	1.986	2.000	1.993
3,000	3.292	3.313	3.303

Figure 1. Example of human iNOS standard curve in 1X Cell Extraction Buffer PTR. The iNOS standard curve was prepared as described in Section 10. Raw data values are shown in the table. Background-subtracted data values (mean +/- SD) are graphed.

ab253217 Human iNOS SimpleStep ELISA Kit

14

16. Typical Sample Values

SENSITIVITY –

The calculated minimal detectable dose (MDD) is 18 pg/mL. The MDD was determined by calculating the mean of zero standard replicates (n=28) and adding 2 standard deviations then extrapolating the corresponding concentration.

RECOVERY –

One concentration of iNOS recombinant protein was spiked in duplicate to the indicated biological matrix to evaluate signal recovery in the working range of the assay.

Sample Type	Average % Recovery
Caco-2 Cell Extract	95

ab253217 Human iNOS SimpleStep ELISA Kit

15

Linearity of Dilution

Linearity of dilution is determined based on interpolated values from the standard curve. Linearity of dilution defines a sample concentration interval in which interpolated target concentrations are directly proportional to sample dilution.

Native iNOS was measured in the following biological samples in a 2-fold dilution series. Sample dilutions are made in 1X Cell Extraction Buffer PTR.

Dilution Factor	Interpolated value	800 µg/mL RAW264.7 Cell Extract
Undiluted	pg/mL	576.3
	% Expected value	100
2	pg/mL	305.7
	% Expected value	106
4	pg/mL	163.3
	% Expected value	113

PRECISION –

Mean coefficient of variations of interpolated values of iNOS from one concentration of Caco-2 cell extract within the working range of the assay.

	Intra-Assay
n =	8
CV(%)	3.3

ab253217 Human iNOS SimpleStep ELISA Kit

16

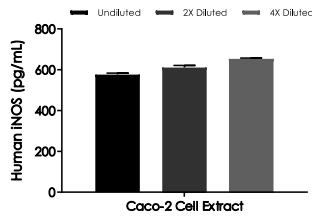


Figure 2. Interpolated concentrations of native iNOS in Caco-2 cell extract samples based on an 800 µg/mL extract load. The concentrations of iNOS were measured in duplicate and interpolated from the iNOS standard curve and corrected for sample dilution. The interpolated dilution factor corrected values are plotted (mean +/- SD, n=2). The mean iNOS concentration was determined to be 613.7 pg/mL in Caco-2 cell extract samples.

ab253217 Human iNOS SimpleStep ELISA Kit

17

17. Assay Specificity

This kit recognizes both native and recombinant human iNOS protein in cell extract samples only.

Serum, plasma, cell culture supernatant, and tissue extract samples have not been tested with this kit.

Please contact our Technical Support team for more information.

ab253217 Human iNOS SimpleStep ELISA Kit

18

18. Species Reactivity

This kit recognizes human iNOS protein.

Species reactivity was determined for mouse by testing RAW264.7 cell extract. The mean iNOS concentration was determined to be 1,052.8 pg/mL in RAW264.7 cell extract samples based on a 400 µg/mL extract load.

Other species reactivity not determined.

ab253217 Human iNOS SimpleStep ELISA Kit

19

19. Troubleshooting

Problem	Reason	Solution
Difficulty pipetting lysate; viscous lysate.	Genomic DNA solubilized	Prepare 1X Cell Extraction Buffer PTR (without enhancer). Add enhancer to lysate after extraction.
	Inaccurate Pipetting	Check pipettes
Poor standard curve	Improper standard dilution	Prior to opening, briefly spin the stock standard tube and dissolve the powder thoroughly by gentle mixing
	Incubation times too brief	Ensure sufficient incubation times; increase to 2 or 3 hour standard/sample incubation
Low Signal	Inadequate reagent volumes or improper dilution	Check pipettes and ensure correct preparation
	Incubation times with TMB too brief	Ensure sufficient incubation time until blue color develops prior addition of Stop solution
	Plate is insufficiently washed	Review manual for proper wash technique. If using a plate washer, check all ports for obstructions.
Large CV	Contaminated wash buffer	Prepare fresh wash buffer
	Improper storage of the ELISA kit	Store your reconstituted standards at -80°C, all other assay components 4°C. Keep TMB Development Solution protected from light.
Precipitate in Diluent	Precipitation and/or coagulation of components within the Diluent.	Precipitate can be removed by gently warming the Diluent to 37°C.

ab253217 Human iNOS SimpleStep ELISA Kit

20

20. Notes

ab253217 Human iNOS SimpleStep ELISA Kit

21

Technical Support

Copyright © 2021 Abcam, All Rights Reserved. The Abcam logo is a registered trademark. All information / detail is correct at time of going to print.

For all technical or commercial enquiries please go to:

www.abcam.com/contactus

www.abcam.cn/contactus (China)

www.abcam.co.jp/contactus (Japan)

Copyright © 2021 Abcam. All rights reserved