

HIPÓTESIS.

El respirar repetidamente bajo cargas inspiratorias resistivas de intensidad leve-moderada es un estímulo suficiente para inducir cambios estructurales en los músculos respiratorios. Parte de estos cambios pueden ser considerados como adaptativos.

En concreto,

- Se producirá daño de membrana en las fibras de los músculos respiratorios en estas condiciones. Este daño desencadenaría o coexistiría con el proceso de remodelamiento y adaptación del músculo.
- Se activará la expresión de los genes codificadores de la isoforma de miosina más resistente a la fatiga (MyHC tipo I). Como consecuencia se modificarán los porcentajes relativos y tamaños de las fibras musculares en los músculos respiratorios.
- Se inducirá una respuesta de tipo inflamatorio en los músculos respiratorios. Esta señal estará modulada por el grado de actividad desarrollado por el músculo y eventualmente por la expresión de citocinas anti-inflamatorias.

La existencia de una *señal sistémica*, coexistente con el estímulo mecánico local, implicará que algunos de los fenómenos mencionados también puedan ser observados en músculos que, al no participar en la respiración, no han sido sometidos directamente a las cargas antes citadas (*efecto de transferencia*).

OBJETIVOS.

1. Evaluar el daño de membrana secundario a la aplicación intermitente de cargas inspiratorias de intensidad leve-moderada en los músculos respiratorios.
Secundariamente:
 - 1.a. Valorar la utilidad de la técnica inmunohistoquímica de detección de fibronectina intracelular en la determinación del daño de membrana.
 - 1.b. Evaluar si existe *efecto de transferencia* a grupos musculares alejados de aquellos que participan en la función respiratoria.

2. Valorar los efectos de la aplicación de las cargas inspiratorias resistivas en los eventuales cambios en la expresión de las isoformas de miosina de cadena pesada, y los porcentajes relativos de las mismas, así como los tamaños de las fibras en los músculos respiratorios.

3. Evaluar los efectos del modelo experimental (traqueostomía y respiración bajo cargas inspiratorias resistivas) sobre la expresión de citocina inflamatoria TNF- α y la citocina anti-inflamatoria IL-10, en los músculos respiratorios.
Secundariamente:
 - 3.a. Valorar si existe *efecto de transferencia* a grupos musculares alejados de aquellos que participan directamente en la respiración.
 - 3.b. Evaluar el eventual efecto modulador de la actividad muscular sobre las expresiones de TNF- α y IL-10. Así como de la segunda citocina sobre la primera.

MATERIALES Y MÉTODOS.

4,1- CONSIDERACIONES GENERALES.

Este capítulo consta fundamentalmente de dos estudios experimentales: El primero es la validación de la técnica inmunohistoquímica de detección de fibronectina intracelular para medir el daño de membrana citoplasmática en las fibras musculares. El segundo es un modelo canino para evaluar los efectos producidos en los músculos respiratorios y periféricos por la aplicación de las cargas inspiratorias resistivas. Este modelo trata de simular la situación crónica que afecta a los mismos músculos en pacientes con EPOC.

El modelo animal de obstrucción al flujo aéreo se diseñó para la realización de esta Tesis Doctoral. Este modelo de obstrucción al flujo aéreo se realizó conjuntamente con el Servicio de Neumología del Hospital de Cruces, Universidad del País Vasco (Vizcaya). El desarrollo experimental del modelo animal, la aplicación de las cargas inspiratorias resistivas, la manipulación de los animales y la obtención de las biopsias laterales y contra-laterales de los músculos: intercostal externo, diafragma y vasto interno, fueron realizadas en el centro de investigaciones de esa institución, de donde posteriormente se enviaron las muestras a nuestro grupo.

Las biopsias musculares de los animales se recibieron en el IMIM por mensajería convencional. Las muestras musculares incluidas en parafina se recibieron a temperatura ambiente y las incluidas en O.C.T. o las criopreservadas directamente sin ningún preservante, según queda especificado más adelante en este capítulo, siempre llegaron en abundante nieve carbónica, en un plazo no mayor de 24 horas posteriores a su obtención. Estas muestras criopreservadas se almacenaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

Las muestras en su totalidad se procesaron por el autor de este trabajo de tesis doctoral en dos laboratorios: Primero, el procesamiento de todas las biopsias caninas para las determinaciones del tamaño y la tipificación fibrilar, así como la determinación porcentual de proteínas estructurales y daño de membrana se realizaron en el laboratorio de investigación del grupo, adjunto al Servicio de Neumología del Hospital del Mar – IMIM. Segundo, la cuantificación de las isoformas de cadena pesada de la miosina (MyHC I y MyHC II) y la expresión de citocinas TNF- α y IL-10, así como de la α -actina, se realizaron en el Laboratorio de Inmunología del Instituto de Biotecnología y Biomedicina “Vicent Villar i Palasí” (Universidad Autónoma de Barcelona).

Se escogió un modelo experimental en perro (raza Beagle) atendiendo, por una parte, a que existen estudios previos de modelos similares en nuestro grupo (Gea, 1997, 2000); y por otra parte, el perro es un animal lo suficientemente grande que nos permite una instrumentalización y manejo adecuado. Otro aspecto importante que hemos tenido en cuenta es que este modelo canino permite una extrapolación de los resultados experimentales obtenidos a eventos similares presentes en pacientes con EPOC. El perro, al igual que el hombre, tiene como principales músculos respiratorios involucrados en la inspiración el diafragma y los músculos intercostales externos.

En este trabajo fundamentalmente utilizamos la técnica de *Procion orange* en un estudio colateral, realizado en ratones, para valorar los resultados obtenidos por la técnica de detección de este colorante con los obtenidos por la técnica de detección de fibronectina intracitoplasmática. Una vez comprobado que existe una elevada correlación entre ambas técnicas determinamos utilizar la técnica de detección de fibronectina intracitoplasmática para evaluar las células dañadas. Esto permitió la evaluación antes y después de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas. No se utilizó la técnica de determinación de pérdida de la desmina citoplasmática ya que los resultados de ésta última se correlacionan inversamente con los obtenidos en la detección de fibronectina (Friden y Lieber, 1998).

4,2- ESTUDIO 1: VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE DETECCIÓN DE FIBRONECTINA INTRACELULAR, EN LA EVALUACIÓN DEL DAÑO DE MEMBRANA.

4,2,1- Población: Estuvo compuesta por 8 ratones jóvenes de raza *Swiss*, que tenían entre 35-40 g de peso.

4,2,2- Biopsias del estudio: Estuvo compuesto por 8 muestras musculares procedentes del *vastus medialis* de estos ratones.

4,2,3- Protocolo para provocar daño de membrana en ratones.

Los ratones se colocaron en posición supina y se fijaron a un soporte plano. El animal fue anestesiado con ketamina 200 ml/Kg y diazepam 5 ml/Kg. En una de las dos extremidades inferiores se indujeron contracciones eléctricas “twitch” a diferentes frecuencias de intensidad (0-80 Hz, Grass Stimulator S48, AstroMed Inc, West Warwick, RI, EEUU) durante 10 min. A las 24 horas de la estimulación se procedió a la infusión de una solución de *Procion orange* al 1% en CINA al 0,9%, en un volumen total 1.2 ml (Sigma Chemical Co, St Louis, EEUU) por vía endovenosa (vena lateral caudal) a un ritmo de 3.6 ml/h (Perfusor Secura FT, Braun, Mesulgen, Alemania) (figura 6). Pasados 30 min., se obtuvieron las biopsias musculares con el animal bajo los efectos de la anestesia general.

4,2,4- Procesamiento de las muestras.

Las muestras musculares se obtuvieron mediante biopsia del músculo antes mencionado e inmediatamente fueron incluidas directamente en una cápsula que contenía ornitil carbamil transferasa (O.C.T) como medio de preservación (O.C.T. Compound, Sakura, Japón). La cápsula con el fragmento muscular se depositó sobre isopentano previamente congelado en nitrógeno líquido durante unos minutos. Este procedimiento proporcionó una congelación gradual de la muestra. Posteriormente se envolvió el bloque en papel de aluminio, se transportó en nitrógeno, y se almacenó a -80°C hasta el momento de su utilización.

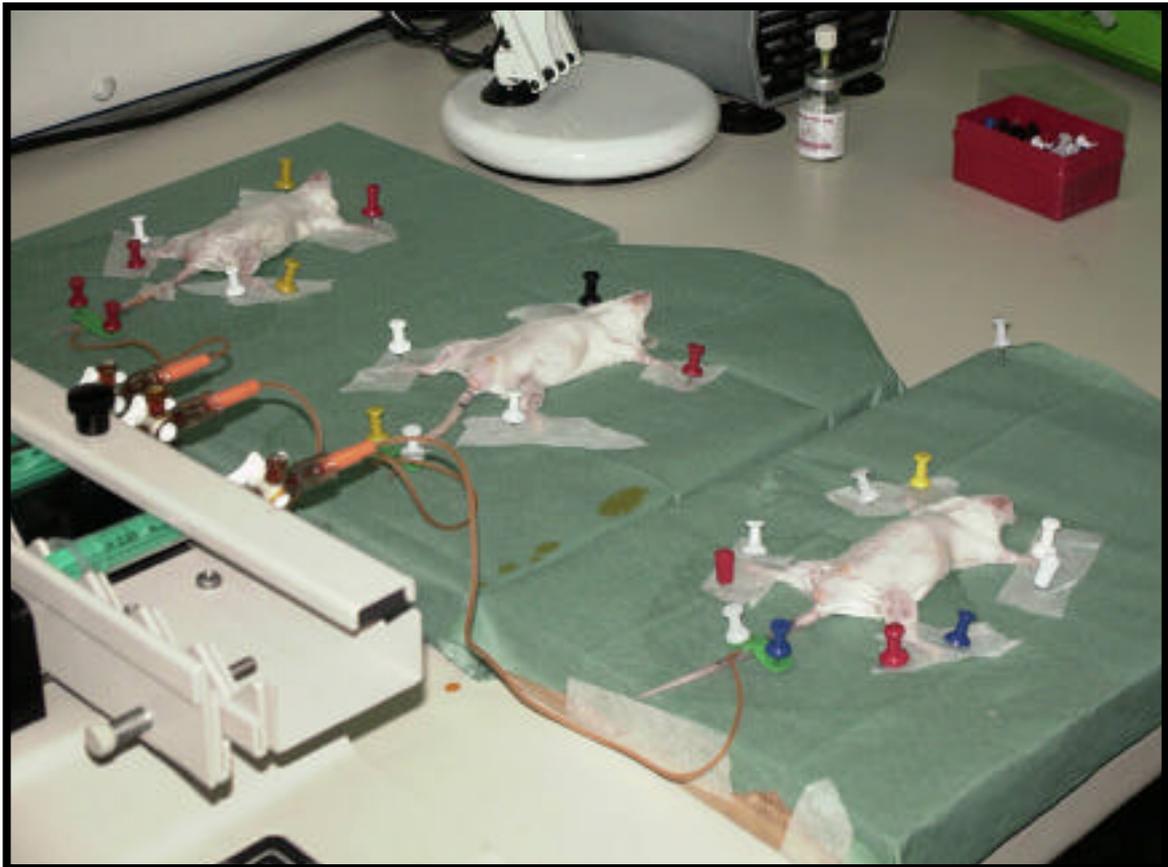


Figura 6. Foto tomada en el laboratorio del Dr. JB. Galdiz. Hospital de Cruces. Universidad del País Vasco. Administración por vía intravenosa del **Procion orange** durante un estudio realizado con ratones para validar la técnica para detectar daño de membrana fibrilar por detección de fibronectina. (Cortesía del Dr. Galdiz).

Se realizaron cortes de 3 μm de espesor, de las muestras criopreservadas en O.C.T., con un criotomo a -20°C (HM 505 E, MICROM Intl GmbH, Walldorf, Alemania), siempre con las fibras musculares orientadas perpendicularmente al plano de corte. El plano perpendicular de las fibras se determinó con una tinción de hematoxilina (hematoxilina de Harris. Sigma diagnostics, ACCUSTAIN[™], San Luis, CA, EEUU) en los primeros cortes realizados de cada bloque. Se depositaron dos cortes en cada portaobjeto previamente tratado con 3-aminopropiltriethoxilano 99% (APES) para una mejor fijación del tejido. Varios cortes de este tejido se almacenaron a -80°C hasta el momento de utilizarlos.

4,2,5- Técnica inmunohistoquímica para la detección de fibronectina intracelular. (Según metodología descrita por Vartio, 1987).

Durante la década de los 90 se desarrollaron diferentes técnicas inmunohistoquímicas con el objetivo de evaluar el daño de membrana, como ya se ha mencionado. El principio general de estos procedimientos está en detectar proteínas celulares y del citoesqueleto que, como consecuencia del daño, tienen una localización atípica en el tejido. Un ejemplo de estas técnicas es la detección de fibronectina (una proteína de localización extracelular) dentro del citoplasma fibrilar como consecuencia del “daño” presente en la membrana de la fibra.

Se llevó a cabo la técnica inmunohistoquímica sobre cortes de tejidos incluidos y criopreservados en O.C.T.. Los cortes se secaron durante 1 hora a temperatura ambiente y se añadieron 50 μl de acetona helada para una mejor fijación del tejido a la superficie del portaobjetos. Finalmente, todos los cortes se incubaron en Tampón Fosfato Salino: NaCl 120 mM/L, KCl 2.7 mM/L, tampón fosfato 10 mM/L, pH 7,4 (PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente.

Para la determinación del daño de membrana por detección de fibronectina intracelular se utilizó el anticuerpo (IgG) policlonal anti-fibronectina (PC057, The Binding Site, Birmingham, Inglaterra) a una dilución de trabajo de 1:400. Cada portaobjetos contenía dos cortes de tejido: en el primero se llevó a cabo la reacción inmunohistoquímica de reconocimiento con el anticuerpo anti-fibronectina y el otro corte del mismo portaobjetos se utilizó como control del sistema de revelado. En este segundo corte se sustituyó el primer anticuerpo por tampón fosfato-salino pH 7,4 y albúmina de suero bovino al 1% (PBS-BSA al 1%). Finalizada la incubación de 1 hora a 37°C , las muestras se lavaron 5 veces a intervalos de 5 min. en PBS. Este paso siempre se repitió igual después de las sucesivas incubaciones que tiene la técnica, utilizando el anticuerpo secundario conjugado con biotina y el complejo

estreptoavidina-peroxidasa. Las diluciones de todos los anticuerpos utilizados se realizaron siempre utilizando PBS-BSA 1%.

El segundo anticuerpo utilizado en la técnica inmunohistoquímica fue anti-IgG de ratón biotinilado (AB600, The Binding Site, Birmingham, Inglaterra) a una dilución de trabajo de 1:200 y las muestras se incubaron a 37°C durante 30 min. Después de los lavados con PBS las muestras se incubaron en una solución de H₂O₂ al 6% durante 15 min. a temperatura ambiente, con el objetivo de inactivar en el tejido la peroxidasa endógena. Finalmente se adicionó el complejo estreptoavidina-peroxidasa (IC019, The Binding Site, Birmingham, Inglaterra) a una dilución de trabajo de 1:200 y las muestras se incubaron en iguales condiciones a la descrita anteriormente. La reacción de coloración de las células que tenían fibronectina dentro de su citoplasma se llevó a cabo sumergiendo las muestras en un tampón que contenía el sustrato 3-3'diaminobenzidina (DAB) (DAB, D5337, Sigma, St Louis, EEUU) 0,025% y 0,1% H₂O₂ en PBS durante 10 min. La reacción enzimática se detuvo con H₂O destilada y las células se contrastaron durante 30 seg. con tinción en hematoxilina de Mayer. Finalmente los cortes de tejido se deshidrataron a diferentes concentraciones de etanol al 70%, 96% y 100%, y finalmente con xilol. Las muestras se montaron utilizando medio soluble para montaje de xilol neutro PERTEX (PERTEX Medite, Burgdors, Alemania).

Las imágenes de las muestras teñidas se captaron en un microscopio óptico (Olympus BX-50, Olympus Optical Company, Tokio, Japón) y se digitalizaron a través del programa Pixera (Pixera Studio 1.2, Visual Communication System, Pixera Corporation, Los Gatos, CA, EEUU). Se contaron más de 100 fibras por corte histológico y se establecieron los porcentajes contabilizando las células que presentaban fibronectina intracelular (células dañadas) y las que no la presentaban (células no dañadas).

4,2,6- Técnica para determinar la presencia de colorante ***Procion orange*** intracelular. (Según metodología descrita por Johnson y Nogrueira, 1981).

La técnica de detección intracelular de *Procion orange* se basa en la difusión pasiva de este colorante de bajo peso molecular a través de los pequeños "poros" que se abren en la membrana celular como consecuencia del daño. Esta técnica se ha establecido como una técnica de referencia o "*gold standard*" en la determinación del daño de membrana. Sin embargo, adolece del defecto de la toxicidad del colorante, por lo que dificulta los estudios de intervención.

Cortes consecutivos, a los realizados para la detección de fibronectina intracelular, se montaron utilizando una solución de p-phenilenediamina al 1% en PBS / glicerol (1:9) y se evaluaron directamente en un microscopio óptico de fluorescencia (Serie Bx 5073, Olympus Optical Company, Tokio, Japón). Se tomaron fotografías a 100x de aumento en una cámara fotográfica Olympus SC35 (Olympus Optical Company, Tokio, Japón). Se contaron más de 100 fibras y se establecieron los porcentajes de células que presentaban *procion orange* en su citoplasma como consecuencia del daño de membrana (figura 7).

Las fibras que presentaron *Procion orange* en su citoplasma fueron contadas como fibras *con daño de membrana* y las fibras que no lo presentaban como fibras *sin daño de membrana*.

TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE DAÑO DE MEMBRANA

Porcion orange vs Fibronectina

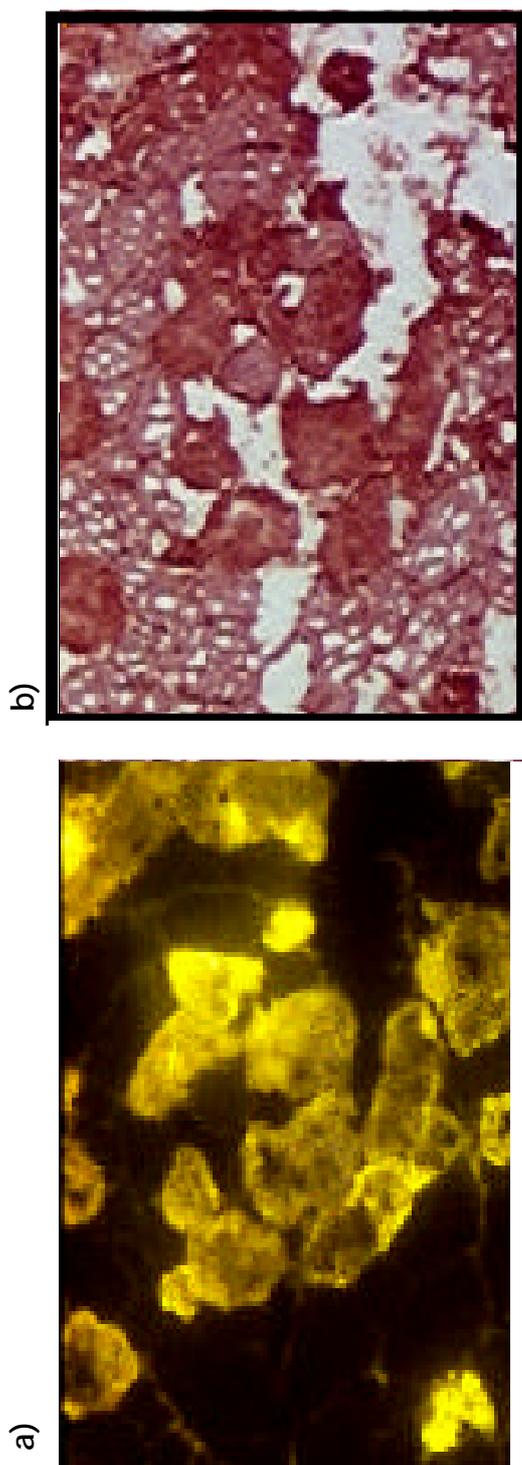


Figura 7. Imágenes digitalizadas de cortes consecutivos de tejido muscular esquelético (*vastus medialis*), de ratones raza Swiss preservados en O.C.T.. a) Determinación de *Porcion orange* intracelular por fluorescencia. b) Determinación de fibronectina intracelular por inmunohistoquímica (anticuerpo anti - fibronectina).

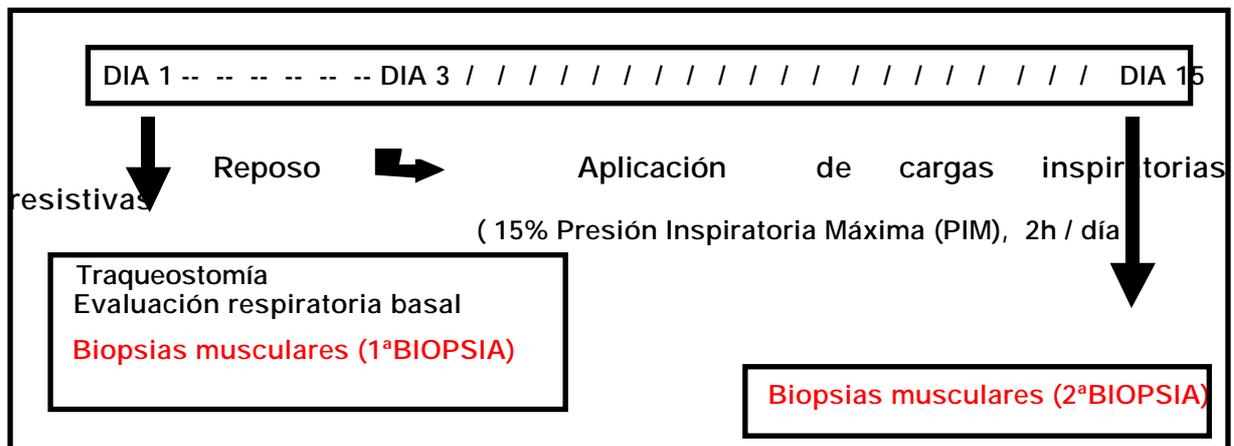
4,3- ESTUDIO 2: MODELO EXPERIMENTAL CANINO PARA LA OBSTRUCCIÓN AL FLUJO AÉREO, CON LA APLICACIÓN DE CARGAS INSPIRATORIAS RESISTIVAS.

4,3,1- Población: grupo estudio y grupo control.

Grupo estudio: Está constituido por 6 perros de raza *Beagle*. A estos perros se les realizó una traqueostomía el primer día de la fase experimental. Se tomaron biopsias de los siguientes músculos: diafragma, intercostal externo y vasto interno del músculo cuádriceps, antes de ser sometidos a ningún tipo de cargas inspiratorias resistivas. El día 15 de la fase experimental, después de haber realizado el programa de cargas inspiratorias resistivas y antes de ser sacrificados, se volvieron a tomar biopsias contralaterales de los mismos músculos.

Grupo control: Está constituido por 3 perros de raza *Beagle*. A este grupo de animales se le realizó el mismo procedimiento que a los animales incluidos en el grupo de estudio. Sin embargo no se sometieron a cargas inspiratorias resistivas durante la fase experimental. El reducido número de animales intervenidos viene determinado por consideraciones éticas.

4,3,2- Esquema general del procedimiento experimental.



4,3,3- Traqueostomía. Protocolo quirúrgico. Obtención de las primeras biopsias (1ª BIOPSIA).

4,3,3,1- Procedimientos para anestesia durante la intervención quirúrgica.

La inducción anestésica se administró a través de una vía periférica en la pata delantera del animal. El procedimiento consistió en la infusión en forma de *bolus* de una mezcla de: 2ml de propofol, 0,5 ml de fentanilo , 0,8 ml de atracurio y 0,5 mg de atropina. Tras la inducción de la anestesia, el animal fue intubado y conectado a un respirador mecánico (OHMEDA CPU1 BOC HEALTH CARE, Maurepas Cedex, París, Francia). Para mantener el animal en fase hipnótica durante el proceso quirúrgico, se realizó una perfusión de una mezcla de 2 mg/ml de: fentanilo (JANSSEN-CILAG, S.A., Madrid, España), atracurio besilato (Glaxo-Wellcome, Madrid, España), y tiopental (Glaxo-Wellcome, Madrid, España), que se ajustó de forma individualizada para cada animal en función de la capacidad para mantener su efecto hipnótico. El estado hipnótico del animal permitió en todo momento una respiración espontánea y el mantenimiento del reflejo corneal. En este momento se procedió a realizar la traqueostomía para la implantación de una válvula de dos vías, y se registraron las mediciones espirométricas simples.

4,3,3,2- Preparación quirúrgica de los animales.

Se colocó a los animales en posición supina con extensión de los miembros y se procedió a pincelar con Betadine (ASTA Médica S.A., Madrid, España), sobre las áreas quirúrgicas, previamente rasuradas. Posteriormente se colocaron tallas estériles formando los sucesivos campos quirúrgicos: cuello en la cara anterior, línea media del abdomen superior, parrilla costal derecha y cara antero-interna del muslo derecho.

4,3,3,3- Procedimiento quirúrgico. Traqueostomía y toma de las primeras muestras musculares.

El procedimiento quirúrgico constó de dos fases: Obtención de las primeras biopsias (1ª BIOPSIA) y traqueostomía con colocación de la válvula.

1- Biopsias musculares.

- 1,1 Biopsia del músculo diafragmático. Se realizó una laparotomía media subxifoidea de unos 4 cm, por la que se mantuvo tracción del hemidiafragma derecho de un espesor total de 1 cm de longitud en el sentido radial (el de las fibras musculares). Este procedimiento se llevó a cabo con disección cortante sin electrocoagular hasta que se obtuvo la muestra. Posteriormente se realizó

una hemostasia de los bordes sangrantes y se cerró el corte con puntos dobles de sutura absorbible (seda nº 1), que se cerró tras una maniobra de *Valsalva* para reducir la posibilidad de neumotorax. El cierre de la laparotomía se realizó por planos con sutura continua de seda nº 1.

- 1,2 **Biopsia del músculo intercostal externo.** Se realizó una incisión de 2-3 cm en la cara anterolateral del hemitorax derecho. Se profundizó a través de todos los planos fasciales musculares hasta la parrilla costal. Se tomó una biopsia del músculo intercostal externo (espesor total) con hoja de bisturí frío de costilla a costilla. Posteriormente, la hemostasia se realizó con un electrocauterio y se cerró la herida por planos.

- 1,3 **Biopsia del músculo vasto interno del cuadriceps (músculo periférico).** Para facilitar el abordaje de la biopsia se practicó una incisión de 2-3 cm de la piel de la cara interna de la pata trasera del animal. La incisión se profundizó a través de planos fasciales hasta el propio vientre muscular. Se procedió a la toma de biopsia de 1 cm de longitud, en el sentido de las fibras musculares y alejada del paquete neurovascular del triángulo de Scarpa. La hemostasia y suturación del tejido se realizaron igual que en la biopsia del intercostal externo.

2- Traqueostomía.

Este procedimiento consta de la abertura de la tráquea del animal y de la implantación de una válvula respiratoria. Tras la preparación de la piel y el campo quirúrgico, se realizó una incisión horizontal de 3 cm en el cuello, 1.5 cm por encima del *yugulum*. Se procedió a la profundización con un bisturí eléctrico a través de los planos subcutáneos y el *platisma colli*. Tras la exposición de la musculatura pretiroidea, se abordó la línea alba, rechazando lateralmente dicha musculatura y exponiendo la tráquea. Se incidió en los anillos 3º y 4º en forma de U invertida, suturándole la solapa formada a la piel del borde inferior de la herida. Tras la retirada del tubo orto-traqueal (T.O.T.) se intubó con una cánula de Shilley nº 6. Se infló el neumobalón y se conectó el tubo al respirador. La incisión cutánea no se cerró o se hizo de forma parcial utilizando los mismos puntos que se utilizaron para la fijación a la piel del escudete de la traqueostomía. Este procedimiento se realizó para la implantación de una válvula de dos vías que permitió posteriormente someter al animal a cargas inspiratorias resistivas.

Se procedió a curas tópicas con Betadine de todas las heridas excepto la traqueostomía y se cubrieron con sucesivas capas de silicona para evitar posibles contaminaciones de las heridas.

4,3,4 Medición de los parámetros respiratorios del animal.

Se determinaron las siguientes variables: volumen corriente (V_T), tiempo inspiratorio (T_I), tiempo total respiratorio (T_{TOT}), frecuencia respiratoria (Fr), resistencia inspiratoria (R_i), trabajo respiratorio total (W_R), flujo inspiratorio en pico (V_I pico), presión traqueal (PT) y resistencia de las vías aéreas (R_{aw}).

- **Medición de volúmenes respiratorios:** Se utilizó un neumotacógrafo tipo Fleish (Poch-Millas, Madrid, España) con integración de la señal de flujos, para obtener los valores de: V_T , FR , T_I y T_{TOT} .
- **Presión traqueal (Pt):** Se midió conectando el tubo endotraqueal a un transductor de presión (Hellige GmbH, freiburg, Alemania, rango ± 250 cmH₂O) acoplado a un transductor de ganancia media.
- **Presión parcial "*end-tindal*" de CO₂ (P_{et} CO₂) y saturación de la oxihemoglobina (SaO₂):** La fracción de CO₂ al final de la espiración (P_{et} CO₂) se determinó mediante un capnógrafo con analizador de lectura rápida por infrarrojos (Hellige GmbH, Freiburg, Alemania), mientras que la de SaO₂ se realizó mediante un oxímetro OHMEDA (modelo Biox 3740, Chicago IL, EEUU).

Los registros de las diferentes señales se realizaron simultáneamente en un polígrafo de papel continuo (milimetrado) de ocho canales y a una velocidad de 2,5 mm / seg (Hellige GmbH, Freiburg, Alemania) y los datos fueron exportados a un ordenador con tarjeta de adquisición de datos (Data Translation 2801-A, Marlboro, CA, EEUU) donde se almacenaron utilizando el sistema Labdat para señales de duración corta o ANADAT TRASLATION (2801-A, Marlboro, CA, EEUU) cuando se precisaron registros continuos de larga duración. Las señales fueron almacenadas y posteriormente analizadas.

4,3,5- Protocolo de cargas inspiratorias resistivas.

A todos los animales del grupo de estudio se les aplicó el siguiente protocolo tras el procedimiento quirúrgico de la traqueostomía:

- Después de estar el animal 30 minutos estable, respirando espontáneamente y con un grado de anestesia superficial, se realizaron las mediciones de los parámetros respiratorios considerados como basales : V_T , T_I , T_{TOT} , FR, R_i , V_I pico, PT y Raw.
- Posteriormente se realizaron oclusiones traqueales hasta conseguir la máxima inflexión inspiratoria. Esta fue considerada como la presión inspiratoria máxima (PIM). Este parámetro sirvió de referencia para el ajuste posterior de la carga. Una vez determinados estos parámetros se dejó que los animales se recuperaran de la anestesia.
- A los animales ya recuperados de la anestesia se les dio un margen de tres días, antes de comenzar el protocolo de cargas inspiratorias resistivas. Estas cargas se aplicaron mediante la colocación de cargas resistivas, sistema PiFlex (sistema de orificios de diferentes diámetros) en la porción inspiratoria de una válvula de dos vías (Hans Rudolf 1210-A) conectada al tubo de traqueostomía.

El protocolo de cargas inspiratorias resistivas se diseñó para aplicar a cada animal una carga del 15% de su presión inspiratoria máxima (PIM) 2 horas por día, (aproximadamente unos 20 cm H₂O / L / seg) (figura 8) . Este procedimiento se aplicó al animal desde el día 3 al 15 de la fase experimental. Al tratarse de un sistema flujo-dependiente, la presión

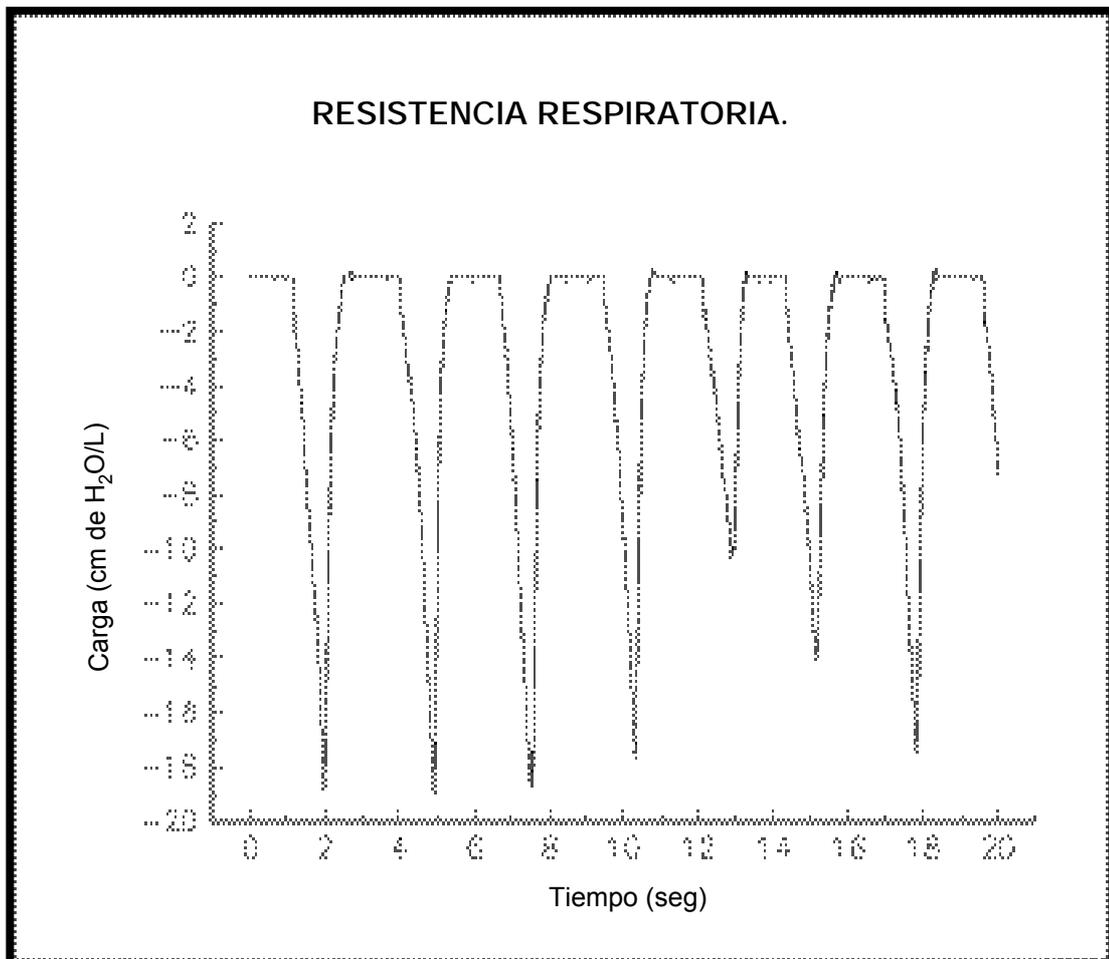


Figura 8. Resistencia respiratoria durante la sesiones de cargas inspiratorias resistivas. Cortesía del Dr. Galdiz, Hospital de Cruces. Universidad del País Vasco.

generada dependió del patrón ventilatorio del animal, por esta razón se ajustó el orificio cuando el animal estaba en situación de reposo y relajado. En estas condiciones era posible modificar el orificio cuando resultaba necesario adecuando la presión inspiratoria.

4,3,6- Obtención de las segundas biopsias (2ª biopsia).

Una vez finalizados los quince días que duró el protocolo de cargas inspiratorias resistivas se tomaron biopsias contralaterales de los mismos músculos. Estas biopsias posteriores (2ª BIOPSIA) se realizaron siguiendo el mismo procedimiento de las anteriores (1ª BIOPSIA). El animal se sacrificó estando anestesiado, justo después de obtener las segundas biopsias, mediante cloruro de potasio administrado por vía endovenosa. Todos los animales murieron por parada cardíaca (asistolia).

4,3,7- Procesamiento de los músculos.

4,3,7,1- Procesamiento de las muestras.

Las biopsias musculares se obtuvieron al principio (1ª BIOPSIA) y al final del estudio (2ª BIOPSIA). Una vez obtenido el fragmento muscular se dividió en dos trozos:

- El *primer fragmento* fue procesado para inclusión en bloques de parafina. Inmediatamente después de la biopsia, el fragmento se introdujo en formaldehído al 10% y posteriormente se procesó en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital de Cruces, para su inclusión en bloques de parafina hasta el traslado a nuestro laboratorio
- El *segundo fragmento* se dividió en dos partes que se introdujeron directamente en crioviales, sin utilizar ningún medio externo de inclusión o preservación. Los crioviales se congelaron en nitrógeno líquido y se transportaron a un congelador de -80°C donde se almacenaron hasta el momento de su traslado.

4,3,7,2- Cortes del tejido muscular preservados en parafina.

Se realizaron cortes de 3 μm en un micrótopo (Leica RM 2035, Nussloch, Alemania). La orientación de las fibras musculares siempre se llevó a cabo con una dirección de las fibras perpendicular al plano de corte. Se colocaron dos cortes de tejido consecutivos sobre un mismo portaobjetos. Los portaobjetos habían sido previamente tratados con APES (Sigma-Aldrich, Alcobendas, España) al 99% para lograr una mejor fijación del tejido al portaobjetos. Finalmente, varios portaobjetos ya preparados con los cortes de tejido de cada músculo se

secaron en una estufa a 80°C durante 10 min. y se almacenaron a 4°C hasta el momento de su utilización.

4,3,7,3- Procesamiento de las muestras congeladas para la obtención de un homogeneizado de proteínas totales del tejido. (Según metodología descrita por Satta, 1997.)

Las biopsias musculares congeladas directamente en nitrógeno líquido se pesaron y se fragmentaron parcialmente con una hoja de bisturí. Este macerado parcial se incluyó en una solución Laemmli de lisis (TrisHCl 62.5 mM, SDS al 2.3% p/v, glicerol al 10% y 2-mercaptoetanol al 5%), en una proporción de 20 µl de solución por cada mg de tejido. Posteriormente se homogeneizó totalmente el tejido utilizando un pistón de teflón (*Potter*) (Sigma-Aldrich, Alcobendas, España), y las muestras se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente. Finalmente, el tejido completamente lisado se incubó a 100°C durante 5 min. y seguidamente se centrifugó (centrífuga Biofuge pico, Heraeus, Berlín, Alemania) a 13 000 g durante 30 min., a 4°C. El sobrenadante, limpio de residuos y detritos celulares, se dispensó en alícuotas que se almacenaron a -20°C hasta el momento de su procesamiento.

Una de las alícuotas congeladas se utilizó para la determinación de proteínas totales de la muestra por el método de Bradford, utilizando el procedimiento indicado en el juego (*Kit*) diagnóstico de la casa BIO-RAD (BIO-RAD Laboratories GmbH, Munich, Alemania). Otra alícuota fue remitida a un grupo colaborador para determinación del RNA mensajero de las isoformas de MyHC. Los resultados de este último procedimiento no se hallan incluidos en esta tesis.

4,4- TÉCNICAS UTILIZADAS.

4,4,1- Tinción de Hematoxilina de Harris (Sheehan, 1980).

La técnica de hematoxilina de Harris (Sigma diagnostics, ACCUSTAIN™, St. Louis, EEUU) se realizó siempre sobre los primeros cortes de tejidos incluidos en parafina. El objetivo de esta tinción era definir la orientación de las fibras musculares con relación al plano de corte y el estado en que se encontraban preservadas.

Se sumergieron los cortes previamente desparafinados en la solución de Harris durante 30 seg y posteriormente se lavaron en agua hasta eliminar el colorante residual. Finalizada la tinción los cortes se deshidrataron en diferentes porcentajes de alcohol etílico y xilol.

4,4,2- Técnicas Inmunohistoquímicas de tinción para la determinación de los tipos de fibras musculares (Gorza, 1986) y del daño de membrana celular (Fidrén y Lieber, 1998).

Se llevaron a cabo técnicas de inmunohistoquímica para la determinación de las fibras I, II y fibras con fibronectina intracitoplasmática. Estas técnicas se realizaron sobre cortes de 3 µm de espesor en tejidos preservados previamente en parafina.

Los cortes se incubaron durante 20 min. en estufa a 80°C y se desparafinaron en baños consecutivos de soluciones de Xilol (Prolabo, MERCKeurolab, París, Francia), xilol-etanol (1:2), etanol absoluto al 100%, 96% y 70% (MERCK, Merck KgaA, Darmstadt, Alemania), durante 5 min., para cada paso. Finalmente, las muestras se incubaron en tampón fosfato-salino: NaCl 120 mM/L, KCl 2.7 mM/L, tampón fosfato 10 mM/L, pH 7,4 (PBS) (Sigma Diagnostics, ACCUSTAIN™, St. Louis, EEUU). Posteriormente las muestras se hirvieron durante 10 segundos en una solución de PBS-ácido cítrico 0.21% (Sigma Chemical, EEUU; Sigma. Aldrich Chemie GmbH, Munich, Alemania) en olla a presión e incubadas en PBS durante toda la noche a 4°C.

Para cada determinación inmunohistoquímica se utilizó su correspondiente anticuerpo. En el caso de la tipificación fibrilar se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-MyHC I (clon MyHCs. Monoclonal antibody, Myosin Heavy Chain Type I. Biogenesis, cat. 6490-4626, Poole, Inglaterra), anti-MyHC II (clon MyHCf. Monoclonal antibody, Myosin Heavy Chain Type II. Biogenesis, cat. 6490-4646, Poole, Inglaterra). Para la determinación del daño de membrana por detección de fibronectina intracelular se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-fibronectina (Human Fibronectin - IgG Fraction, PC 057, The Binding Site, Birmingham, Inglaterra).

Cada portaobjetos contenía dos cortes de tejido. El primero se utilizó para llevar a cabo la tinción inmunohistoquímica y el segundo como control para detectar cualquier posible unión inespecífica. Después de todas las incubaciones, las muestras se lavaron en PBS, cinco veces a intervalos de 5 min. Todos los anticuerpos primarios se incubaron durante una hora a 37°C en cámara húmeda, a una dilución de trabajo de: 1:100 para los anticuerpos anti MyHC I y II, y 1:250 para el anticuerpo anti-fibronectina. Las diluciones de todos los anticuerpos se realizaron en PBS- albúmina de suero bovino 1% (PBS-BSA 1%) (Boehringer Mannheim GmbH, Munich, Alemania).

El segundo anticuerpo o conjugado utilizado en todas las técnicas inmunohistoquímicas fue un anti-IgG de ratón biotinilado (Universal Secondary – Biotin, ref. AB6000, The binding Site,

Birmingham, Inglaterra), a una dilución de trabajo de 1:200 en PBS-BSA. Las muestras se incubaron a 37°C durante 60 min. y posteriormente se lavaron. Se realizó una incubación del tejido en H₂O₂ al 6% (Sigma Chemical, EEUU; Sigma.Aldrich Chemie GmbH, Munich, Alemania) a temperatura ambiente durante 15 min. para eliminar la peroxidasa endógena del tejido. Posteriormente las muestras se incubaron con el complejo estreptoavidina-peroxidasa (Streptavidin-PEROX, ref. IC019, The Binding Site, Birmingham, Inglaterra) con el objetivo de amplificar la reacción de reconocimiento. La coloración de las fibras teñidas se llevó a cabo con una reacción con 3-3`diaminobencidina 0,025% (DAB) (Sigma, ref. D5337, Sigma Chemical, EEUU; Sigma.Aldrich Chemie GmbH, Munich, Alemania), 0,1% H₂O₂ en PBS durante 10 min. La reacción enzimática se detuvo con H₂O destilada y las células se contrastaron con tinción en hematoxilina de Harris (Sigma diagnostics, ACCUSTAIN™, St. Louis, EEUU) durante 30 seg. Finalmente los cortes se deshidrataron en diferentes concentraciones de alcohol etanol (70%, 96% y 100%) y xilol.

Las imágenes de las muestras se captaron en un microscopio (Olympus BX-50F3, Olympus Optical Co. Tokio, Japón) a 100x de aumento y se digitalizaron a través del programa Pixera (Pixera Studio, versión 1,2 1996-1998. Pixera Corporation, CA, EEUU). Una vez digitalizadas las imágenes se utilizó el programa informático "NIH image" (versión 1,6) para realizar las mediciones del diámetro menor de las fibras (Dm); así como para establecer las proporciones de fibras tipo I y II presentes en el tejido (figura 9).

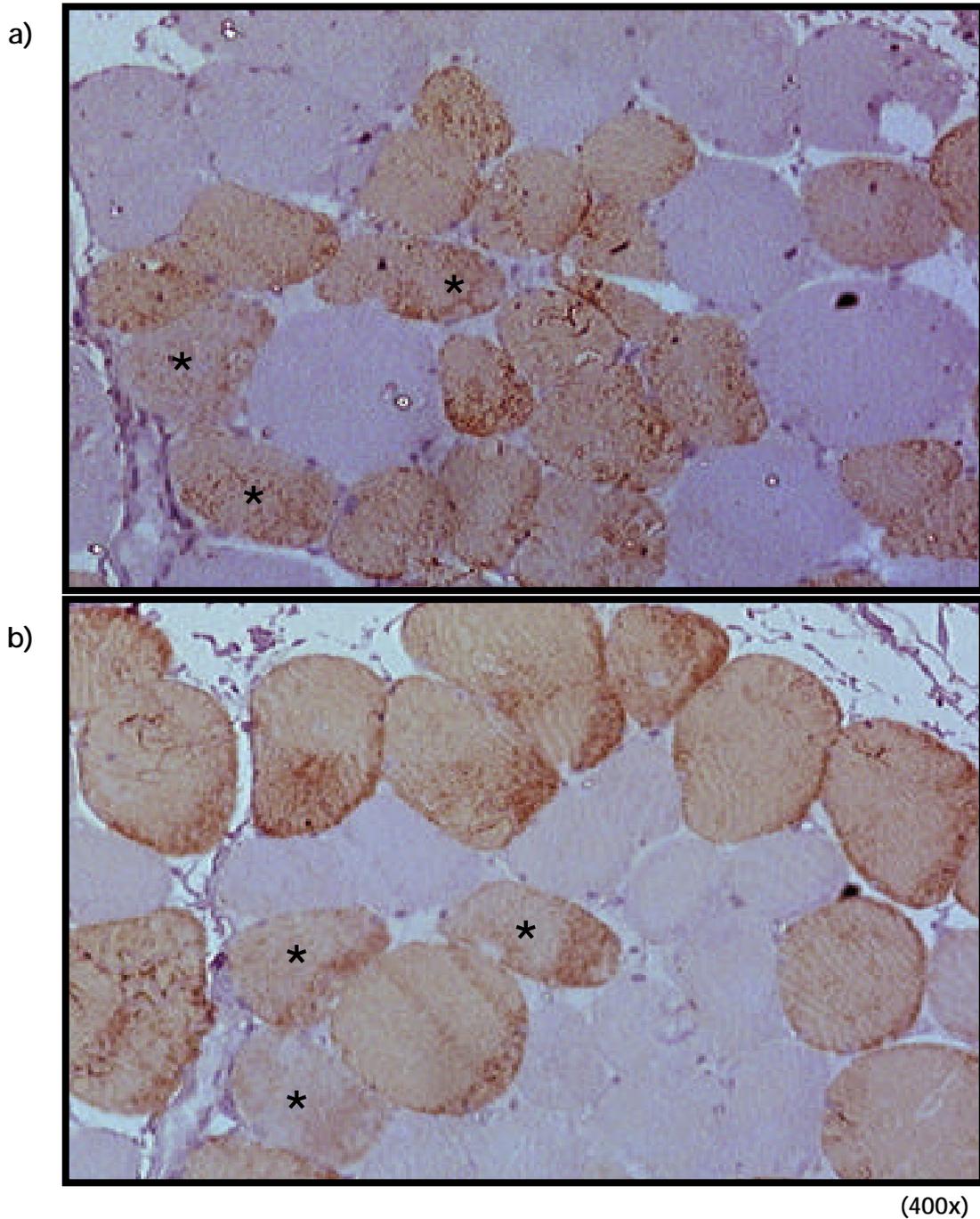


Figura 9. Cortes consecutivos de las fibras musculares esqueléticas del músculo intercostal externo, perros *Beagle*. Tinción inmunohistoquímica para la determinación de fibras I y II (teñidas en color marrón). a) Fibras I (anticuerpo monoclonal anti MyHC I). b) Fibras II (anticuerpo monoclonal anti MyHC II). (*) Fibras híbridas teñidas frente a los dos anticuerpos monoclonales.

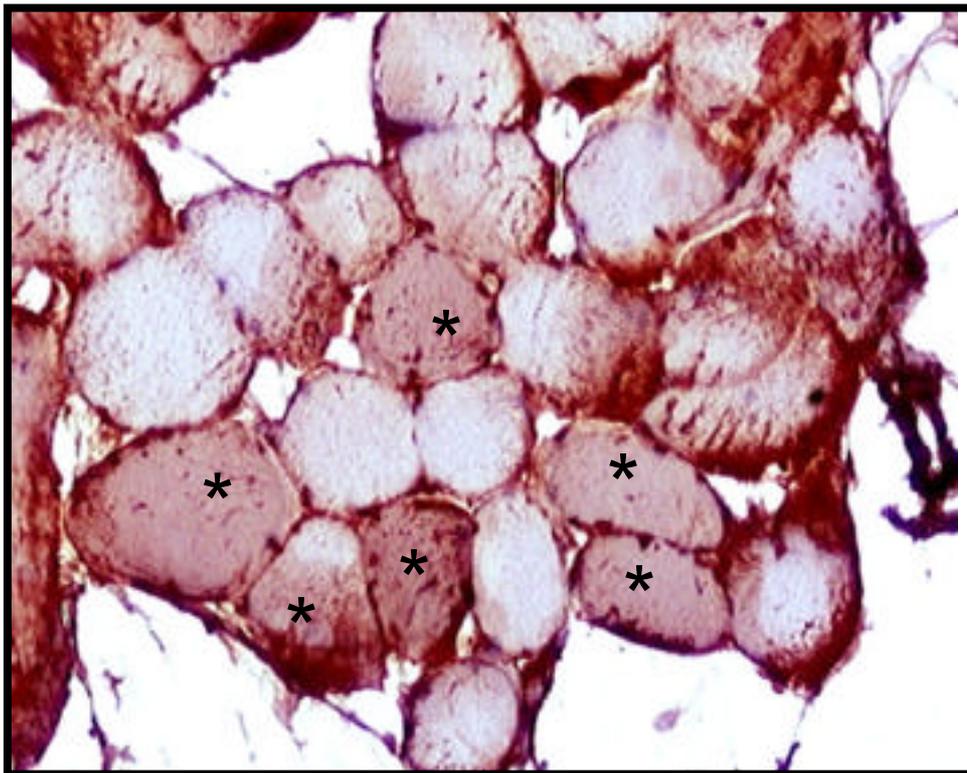
Se analizaron siempre más de 100 fibras por corte histológico y se establecieron los porcentajes de expresión fibrilar para cada una de las isoformas de MyHC. En el caso de la fibronectina se evaluaron campos digitalizados para más de 100 fibras y se contabilizaron las que presentaban fibronectina intracelular para establecer la proporción de células dañadas. Como ya se ha mencionado anteriormente se contabilizó como fibra dañada aquella que presentó acúmulos de fibronectina en su citoplasma (figura 10).

4,4,3- Técnica inmunoenzimática para la semicuantificación de isoformas I y II de cadena pesada de miosinas. (Según metodología descrita por Lepp y Martínez, 1989).

La finalidad de desarrollar esta técnica inmunoenzimática fue determinar las concentraciones de MyHC I y II en los homogeneizados celulares, con vistas a comprobar si las concentraciones de estas isoformas variaban después de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas. Para realizar la técnica partimos de una concentración fija de todos los homogeneizados celulares, de 200 µg de proteínas totales/ml.

Se determinaron los valores de proteínas totales. El valor de proteínas totales presentes en los homogeneizados celulares se determinó por el método de Bradford (BIO-RAD PROTEIN ASSAY, Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU); y se ajustó la concentración de proteínas totales en cada caso a una concentración de 200 µg de proteínas totales/mL en tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6 (0,1 M de $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$, pH 9,6 ajustado con una solución 1M de NaOH). Se colocaron 100 µl de la solución de proteínas a una concentración de 200 µg/mL de cada muestra, por triplicado, en cada pocillo de una placa de ELISA de poliestireno de 96 pocillos (Costar, Cambridge, Inglaterra).

Previamente se preparó una curva de concentración conocida de albúmina de suero bovino. Esta curva patrón nos permitió cuantificar las cantidades de MyHC I y II presentes en cada una de las muestras originales. Para ello se partió de una solución de BSA con una concentración 1 mg/mL y se realizó una serie de 5 diluciones de concentraciones conocidas de BSA en tampón carbonato-bicarbonato a pH 9,6 (31.25, 7.81, 1.95, 0.48 y



(200x)

Figura 10. Corte transversal de tejido muscular correspondiente. Músculo vasto interno. Tinción inmunohistoquímica para detectar fibronectina intracitoplasmática en la fibra (anticuerpo policlonal anti - fibronectina). (*) Fibras positivas (con daño de membrana plasmática) en color marrón.

0.12 µg/mL de BSA). De cada una de estas concentraciones se depositaron 100 µl /pozo por triplicado en las placas de ELISA.

Para cada anticuerpo primario, anti MyHC I y II, se prepararon placas diferentes de 96 pocillos con las muestras a analizar, y en cada placa se incluyó también la curva de BSA patrón de concentración conocida, para calcular la concentración de la isoforma MyHC que se estaba reconociendo.

Las placas se incubaron una hora a temperatura ambiente y después se dejaron toda la noche a 4°C para permitir que todas las proteínas se fijaran al substrato de poliestireno. Finalizada la incubación se adicionaron 200 µl/pozo de una solución de bloqueo de Gelatina 0,5% (Boehringer Mannheim GmbH, Munich, Alemania) en PBS para saturar los pozos de proteína y evitar cualquier unión inespecífica de los anticuerpos primarios a la placa. Se incubaron las placas con esta solución de bloqueo durante una hora a 37°C en cámara húmeda.

Para las determinaciones de isoformas de MyHC se utilizaron como anticuerpos primarios los siguientes anticuerpos monoclonales: anti MyHC I y anti MyHC II. Estos anticuerpos monoclonales son los mismos que se utilizaron en la técnica de inmunohistoquímica para la tipificación de fibras musculares.

Todos los anticuerpos primarios fueron previamente estandarizados a las diluciones de trabajo, que posteriormente se utilizaron en el desarrollo de la técnica. Para cada uno de ellos se probaron diluciones que iban desde 1:50 hasta 1:500 con el objetivo de establecer a qué dilución los anticuerpos primarios presentaban un mejor reconocimiento del antígeno. Una vez analizados estos resultados, los anticuerpos se diluyeron en PBS a las siguientes concentraciones de trabajo para el análisis de todas las muestras: anti MyHC I 1:50, anti MyHC II 1:100 y anti BSA 1:100.

Se depositaron 100 µl/pocillo de anticuerpo primario en dos de los tres pocillos que contenían la misma muestra del homogeneizado. En el tercer pocillo se colocaron 100 µl de PBS en vez del anticuerpo primario para utilizarlo como "blanco". En los pocillos donde se habían fijado las concentraciones conocidas de BSA, para utilizarlas como curva patrón, se depositaron 100 µl de anti-albúmina bovina dilución de trabajo 1:100 en PBS (clon BGN/B2: Ig, ELISA, ref. 0220-

1239, Biogenesis, Poole, Inglaterra) en dos de ellos y en el tercero se sustituyó el anticuerpo primario por 100 µl de PBS para utilizarlo como “blanco”.

De esta forma todos los homogeneizados tenían su propio “blanco”, así como la curva patrón de concentración conocida de BSA. El valor de absorbancia final obtenida en los “blancos” se restó de la media de los valores de absorbancia obtenidos en los dos pocillos con el anticuerpo primario. Este procedimiento se llevó a cabo para cada una de las muestras utilizadas, y para los valores de absorbancia de la curva de BSA.

Todas las placas, con el anticuerpo primario, se incubaron durante 3 horas a 37°C en cámara húmeda. Posteriormente se lavaron 5 veces (5 min. cada vez) con PBS-Tween 20 al 0,05% (polixietilensorbitanmonolaurato. Merck-Schuchardt, Darmstadt, Alemania). Estos lavados se repitieron siempre después de cada incubación con cualquiera de los anticuerpos utilizados en el desarrollo del ELISA.

Posteriormente se adicionaron a cada pocillo 100 µl de anti IgG de ratón conjugado con biotina (Universal Secondary antibody Biotin, ref. AB6000, The Binding Site, Birmingham, Inglaterra), a una dilución de trabajo de 1:400 en PBS, y se incubó nuevamente durante 60 min. a 37°C. Una vez terminada la incubación y realizados los lavados con PBS-Tween 20, se adicionó a cada pocillo el complejo estreptoavidina-peroxidasa (ref. IC019, The Binding Site, Birmingham, Inglaterra) a una dilución de trabajo de 1:400 en PBS, y las placas nuevamente se incubaron en las mismas condiciones anteriores. Finalizado este procedimiento las placas se lavaron y se depositaron 100 µl del substrato cromogénico 3-metil-2-benzotiazolina hidrazona hidrocloreto (MBTH. Sigma, St Louis, EEUU) 1,88 mM; y 3-ácido dimetilaminobenzóico (DMAB. Sigma, St Louis, EEUU) 180 mM en tampón fosfato 0,1 M pH 7 ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$). La reacción enzimática se detuvo en todos los casos a los 10 minutos, adicionando a cada pocillo 50 µl de una solución de H_2SO_4 2N (Merck-Schuchardt, Darmstadt, Alemania). Las placas se leyeron en un lector para placas de ELISA (Labsystems Multiskan MS, Inglaterra) a 620 nm, para determinar la absorbancia.

4,4,4- Técnica de electroforesis para la separación de las isoformas de MyHC en los homogeneizados celulares (Talmadge y Roy, 1993; Satta, 1997)

Esta técnica se realiza con el objetivo de conocer los porcentajes relativos de cada una de las isoformas de MyHC entre sí, presentes en el homogeneizado de tejido muscular.

Partimos de obtener el valor de proteína total en cada homogeneizado. El valor de proteína total se determinó por el método de Bradford (BIO-RAD PROTEIN ASSAY, Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU). Se utilizó para cada recorrido electroforético una cantidad de muestra del homogeneizado diluida en tampón de Laemmli (5 µg de proteínas totales). Todas las muestras se procesaron por duplicado. En cada gel se corrió conjuntamente: una muestra control de MyHC I obtenida de músculo *soleus* de conejo, una muestra control de MyHC IIa y IIb de intercostal externo de conejo y un patrón de peso molecular (High prestained SDS-PAGE Standards, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU). Las muestras control de MyHC I, IIa y IIb se obtuvieron por cortesía del Dr. Reggiani (Istituto Fisiologia Umana, Universidad de Pavia, Pavia, Italia).

Para realizar la electroforesis de proteínas se utilizó un equipo Protean II (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU). Se confeccionó un gel de Acrilamida-Bisacrilamida (Bio-Rad Laboratories, 40% Acrilamida/Bis solución, 19:1 (5%C) Acrilamida: N,N'-Metilenbisacrilamida, Bio.rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU) discontinuo al 4% y 6%. El gel concentrador (4%) estuvo compuesto por: solución de acrilamida (19:1) 0.8mL, tampón superior pH 6,8 (5 M de Tris-HCl, 0,4% SDS) 1,5 mL; Glicerol 50% 3,2 mL; H₂O mili Q 0,5 mL ; persulfato de amonio 10% 40 µL; y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamida (TEMED) 10 µL). El gel separador (6%) estuvo compuesto por: solución de acrilamida (18:1) 3 mL; tampón inferior pH 8,8 (1,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS) 3,75 mL; Glicerol 50% 7 mL; H₂O mili Q 1,25 mL; persulfato de amonio 10% 75 µL; y TEMED 30 µL. El recorrido electroforético de las proteínas se llevó a cabo durante 20 horas, a 4°C y voltaje constante de 100 voltios.

Para realizar la tinción de las bandas de proteínas en el gel de electroforesis, el gel separador se sumergió durante una hora en una mezcla de tinción con Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio.rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU) metanol 50%, ácido acético 10% y Coomassie 0,1%; en agitación lenta. Posteriormente el gel se lavó en una solución de ácido acético al 7% durante 24 horas, en agitación lenta, hasta que quedó totalmente decolorado y las bandas de proteínas teñidas (figura 11).

Las bandas de proteínas teñidas se digitalizaron utilizando para ello un equipo (Gel Doc 2000, BioRad, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU) y el programa específico para este fin ("Molecular Análisis", Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU). Una vez digitalizadas las imágenes de los geles, se procedió a cuantificarlas a través del mismo programa que contiene un analizador de densitometría de las bandas. Este analizador permitió ver claramente, en forma de picos, la cantidad de proteína de cada una de las isoformas de MyHC a analizar, y establecer los porcentajes relativos de las mismas. La suma de las áreas bajo la curva de las bandas de MyHC I y II conformaron el 100% del área total, y a partir de ahí se obtuvo el porcentaje relativo de cada una de las isoformas de MyHC.

4,4,5- Técnica de inmunotransferencia e inmunodetección de isoformas de MyHC I y II (Towbin, 1979).

Esta técnica de inmunodetección se realizó solamente en el primer momento antes del análisis de las muestras incluidas en el protocolo. Su objetivo fue determinar correctamente el patrón de migración de las bandas que correspondían a las isoformas de MyHC en la separación electroforética y, por otro lado, demostrar que los anticuerpos monoclonales utilizados para reconocer MyHC I y II eran específicos para estas isoformas en el modelo canino, y no existía reacción cruzada entre ellas o con otras proteínas del homogeneizado.

Primeramente se realizó una electroforesis en gel de acrilamida, similar a la descrita en el apartado anterior. En ella se utilizaron como muestras: algunos homogeneizados celulares obtenidos de los músculos caninos a analizar posteriormente (5 µg de proteína total/pocillo), extracto de proteínas de músculo *soleus* de conejo (que presenta MyHC I como isoforma dominante), extracto de proteínas de fibras únicas de músculo intercostal de conejo (que sólo contenía MyHC IIa y IIb) y una muestra control de proteínas de diferentes pesos moleculares (BioRad, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU).

PATRÓN DE BANDAS DE LAS ISOFORMAS ADULTAS DE MyHC.

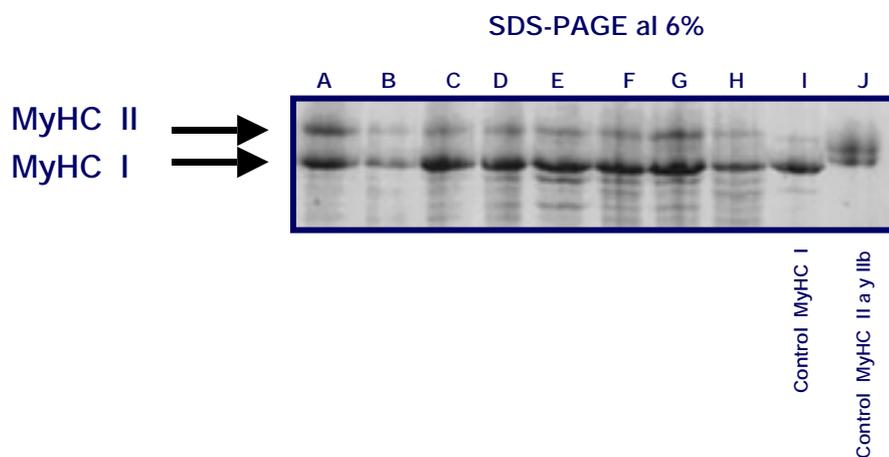


Figura 11. Imagen digitalizada de un gel de acrilamida al 6%. Patrón de migración electroforético de las isoformas de MyHC obtenidas en homogeneizado de músculos. (A) y (B) Músculo intercostal externo, de perro. (C) y (D) Músculo diafragma, de perro. (E), (F), (G) y (H) Músculo vasto interno, de perro. (I) Músculo *soleus* de conejo, control de MyHC I. (J) Fibra única híbrida del músculo intercostal externo de conejo, control de MyHC IIa y IIb.

Estas muestras se colocaron por triplicado depositando una en cada uno de los 3 bloques en que se dividió el gel de electroforesis. Una vez finalizada la separación electroforética: uno de estos bloques de gel fue fijado y teñido con Azul de Coomassie para determinar las bandas de MyHC. Los otros dos bloques restantes fueron transferidos utilizando un equipo de transferencia de proteínas (Bio-Rad transfer, protean II. Bio.rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU) durante 2 horas, a 100 voltios constante. Las bandas de proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham LIFE SCIENCE, Amershan International plc., Londres, Inglaterra).

Una vez finalizada la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, esta se cortó de forma tal que se separaron los dos bloques o juegos de proteínas restantes. Ambos trozos de membrana se bloquearon en una solución de leche descremada al 5% (Sveltesse desnatado, Nestlé, Lausanne, Suiza) y BSA al 1% en PBS durante toda la noche, para impedir cualquier unión no específica de los anticuerpos monoclonales utilizados en la inmunodetección. Terminada la incubación, las membranas se lavaron con abundante PBS (5 veces/5 min. cada vez).

La detección de las isoformas de MyHC se realizó por separado. Una de las membranas se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente y en agitación lenta con anticuerpo monoclonal anti MyHC I, a una dilución de trabajo 1:250 en PBS-BSA al 1%. La otra membrana se incubó en iguales condiciones pero utilizando el anticuerpo monoclonal anti MyHC II. Estos anticuerpos son los mismos que posteriormente se utilizaron en la técnica inmunohistoquímica para la tipificación de fibras en los músculos estudiados.

El sistema de revelado de ambas membranas de nitrocelulosa es el mismo que el descrito para las técnicas de inmunohistoquímica. Una vez finalizada la incubación con los anticuerpos monoclonales respectivos, ambas membranas se lavaron abundantemente en PBS. Posteriormente se incubaron con anticuerpo anti-IgG de ratón biotinilado, a una dilución de trabajo 1:250 en PBS-BSA al 1%, durante 60 min. a temperatura ambiente con agitación lenta. Después, las membranas se lavaron en PBS y se incubaron con el complejo estreptoavidina-peroxidasa a una dilución de trabajo de 1:250 en PBS- BSA al 1%. Una vez lavadas las membranas, el revelado se llevó a cabo con una solución de DAB como substrato cromogénico de la reacción enzimática de la peroxidasa, en similares condiciones a las utilizadas en las técnicas de inmunohistoquímica. Este paso se realizó durante 10 min. aproximadamente y la reacción enzimática se detuvo con agua destilada (H₂O mili-Q).

Las membranas (figura 12) se digitalizaron en el Gel Doc 2000 con epi-iluminación homogénea a través del ya citado programa "Molecular Análisis". Esta técnica no sólo permitió caracterizar las bandas de proteínas correspondientes a las isoformas de MyHC en el gel de acrilamida sino también permitió caracterizar las muestras control que íbamos a utilizar en la técnica de electroforesis de MyHC, para separar las isoformas. Por otra parte, se comprobó que los anticuerpos primarios utilizados para identificar MyHC I y II, en el modelo canino, no presentaban reacción cruzada con otras proteínas del homogeneizado, ni entre ellas.

4,4,6- Técnica de transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). (Según procedimiento establecido por Pinelli, 1999).

Para la realización de la técnica de transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) se utilizó la otra parte del músculo congelado directamente a -80°C . La técnica de retrotranscripción se realizó partiendo de la obtención de ácido ribonucleico total (RNA t) de las biopsias de tejido.

El RNA total de cada muestra se extrajo por el método de TRIZOL (Gibco-BRL, Paisley, Renfrewshire, Inglaterra) de acuerdo con las indicaciones técnicas establecidas por la casa comercial. El RNA total se cuantificó mediante el protocolo "Nucleic Acid QuickSticks" (Clontech Laboratories, Inc, CA, EEUU).

La transcripción reversa, o síntesis de una copia de ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) se llevó a cabo utilizando 1 μg de RNA total extraído en 10 μl de agua libre de RNAasa, enzima transcriptasa reversa M-MLV (Moloney Leukemia Virus) y un cebador de oligo dT según protocolo de la casa comercial (Gibco- Life Thecnologie Paisley, Inglaterra).

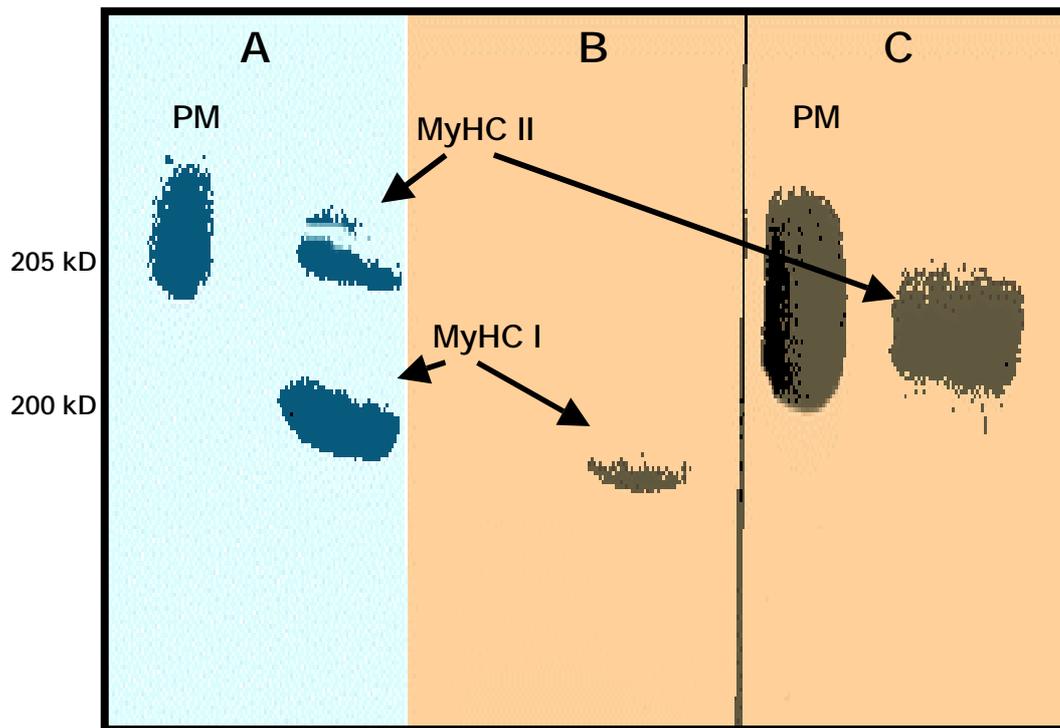


Figura 12. Imagen digitalizada de un gel de poliacrilamida 6% (SDS-PAGE) y membranas de nitrocelulosa (inmunodetección) de MyHC I y II en homogeneizado de músculo intercostal externo, perros *Beagle*. (A) Gel de poliacrilamida 6%. (B) Inmunodetección de MyHC I (anticuerpo monoclonal anti MyHC I). (C) Inmunodetección de MyHC II (anticuerpo monoclonal anti MyHC II). (PM) Patrón de peso molecular.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo utilizando 2 μ L de la copia (cDNA) del RNA total obtenido en la retrotranscripción. Para las determinaciones de interleucina 10 (IL-10) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) partimos de una dilución del 1:5 del cDNA. Para la determinación de α -actina, utilizada como gen control o “*house keeping gene*”, la dilución realizada fue de 1:25 en H₂O, tratada con 0,1% dietilpirocarbonato (H₂O-DEPC) (LIFE TECHNOLOGIES^R, Paisley, Francia).

Los cebadores utilizados en las reacciones de PCR para cada uno de los cDNA analizados fueron los siguientes:

TNF- α	3'	GCCTCAGCCTCTTCTCCT	Pinelli, 1999
	5'	CTTGTCACCTTGGGGTTCG	
IL-10	3'	TCACCTGCTCCACCGCCTTGC	Zucker, 1994
	5'	GGGAGCCAGCCGACACCAGAG	
actina	3'	GCTTCGGGCGGAACGTGTA	No publicada
	5'	TTGATGTCACGCACGATCT	

Este último se diseñó específicamente para nuestro estudio, utilizando para ello el *Software* “OLIGO: DNA / RNA Primer Análisis” (versión 4.1).

Como se ha mencionado la α -actina se utilizó como gen control de la cantidad de cDNA presente en cada una de las reacciones de retrotranscripción. La reacción de PCR se desarrolló en las siguientes condiciones: 1 mM de MgCl₂, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 2 mM de dNTPs (LIFE TECHNOLOGIES^R, Paisley, Francia), 1,25 unidad de Taq polimerasa (Perkin-Elmer, Foster City, EEUU) y 0,5 μ M de cebadores ajustados a un volumen total de reacción de 10 μ L. Para todos los genes amplificados se utilizaron 2 μ L de las diluciones especificadas anteriormente de cDNA, obtenido por retrotranscripción, en cada una de las biopsias. La reacción se llevó a cabo en un equipo Perkin-Elmer (Perkin-Elmer Cetus DNA Thermal Cycler, Foster City, CA, EEUU).

Los ciclos realizados en cada uno de los compuestos fueron de la siguiente manera: se realizó un ciclo inicial “*hot start*”, antes de adicionar la Taq polimerasa. Este ciclo consistió en calentar a 97°C durante 3 min. y después a 85°C durante 5 min. Durante estos 5 min. se le adicionó el enzima a todas las muestras. Las condiciones restantes variaron de la siguiente forma: el TNF- α y IL-10 se amplificaron durante 35 ciclos a una temperatura de unión de 62°C y 67°C respectivamente; y la β -actina se desarrolló a una temperatura de unión de 54°C durante 28 ciclos. Al finalizar todos los ciclos de la PCR se dejaron todas las muestras para completar la reacción de extensión durante 7 min. a 72°C.

Una vez finalizada la PCR se cuantificaron las muestras en electroforesis de agarosa al 2% con bromuro de etidio. En cada una de las electroforesis se hizo migrar un patrón de peso molecular (GC-015-001 Hpa II-pBS-DNA, Gene Craft, Londres, Inglaterra). Las imágenes se digitalizaron y se cuantificaron utilizando el equipo Gel Doc 2000 y el programa “Molecular Analysis” (Bio-Rad) (figura 13).

Para estandarizar la técnica de RT-PCR en cada uno de los cDNAs amplificados para el TNF- α , IL-10 y β -actina, previamente se obtuvo sangre periférica con heparina de un perro de la misma raza (*Beagle*) que los perros utilizados en el estudio. La sangre se diluyó 1:2 con medio Dulbecco’s modificado por Eagle’s (DMEM) y centrifugada durante 20 min. a 4°C y 13 000 g. Se separó la población leucocitaria utilizando un gradiente de ficoll (densidad 1070 g/l) y se lavó dos veces más con DMEM para eliminar los restos de ficoll. Los leucocitos se estimularon con 1 μ g de lipopolisacárido (LPS) a una concentración de células de 1 x 10⁶ células/ml, y se incubaron durante 24 horas a 37°C en incubador de CO₂ al 5%.

Una vez concluido el tiempo de incubación, la población leucocitaria se aisló utilizando un gradiente de densidad de ficoll (1079 g/L). Se aisló el RNA total de la población leucocitaria estimulada, y se desarrolló la retrotranscripción para obtener el cDNA en las mismas condiciones antes descritas. La puesta a punto de la técnica de PCR para cada una de las citocinas estudiadas, así como de la β -actina, se realizó utilizando este cDNA de la población leucocitaria estimulada. De esta forma se caracterizó el tamaño de los amplímeros obtenidos en cada caso: IL-10 386 pb, TNF- α 167 pb, y β -actina 593 pb,

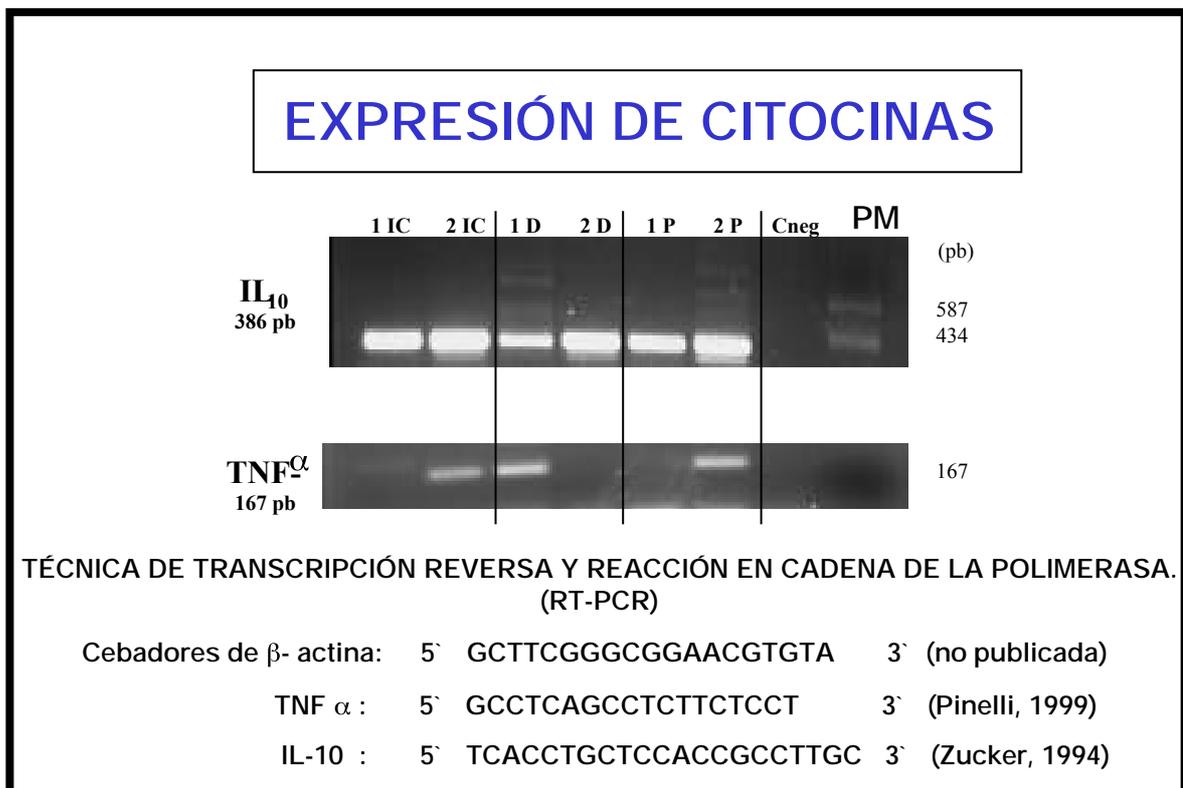


Figura 13. Imagen digitalizada de un gel de agarosa al 2% que contiene los fragmentos amplificados obtenidos por RT-PCR para las citocinas: TNF- α y IL-10 en diafragma (1D y 2D, 1^a y 2^a BIOPSIA respectivamente), intercostal externo (1IC y 2IC, 1^a y 2^a BIOPSIA respectivamente) y vasto interno (1P y 2P, 1^a y 2^a BIOPSIA respectivamente) de perros de raza *Beagle*.

respectivamente. También se realizó la técnica de PCR para cada citocina durante un número variable de ciclos y de esta forma se determinó el número de ciclos adecuado. En ninguno de los casos se cuantificó un amplificado que estuviera en la fase de saturación de la curva. Finalmente los controles utilizados en este estudio presentaron unos patrones de migración y densidad del amplímero como se observa en la figura 14.

Una vez puesta a punto la técnica de PCR se realizaron todas las determinaciones de las muestras por triplicado. El valor experimental reflejado en los resultados es el valor medio obtenido de las tres determinaciones realizadas a cada muestra. Todas las muestras de un mismo animal para las determinaciones de β -actina, IL-10 y TNF- α se realizaron el mismo día, así como las electroforesis del producto final de la PCR que se colocaron en el mismo gel de agarosa al 2%. Los valores de IL-10 y TNF- α están expresados como la razón entre el valor obtenido en cada una de la citocinas y el obtenido en la amplificación de β -actina en cada muestra.

4,5- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se realizó mediante estadística descriptiva, comparativa y de correlación entre las diferentes variables estudiadas. Estos análisis se llevaron a cabo mediante el paquete estadístico SPSS x PC 6.1 para Windows.

4,5,1- Análisis descriptivo.

La descripción de las variables cuantitativas se realizó utilizando los valores medios (\bar{x}) y el error estándar de la media (\pm e.s ó SEM).

4,5,2- Análisis comparativo.

Dada la distribución no normal de las diferentes variables (prueba de Kolmogorov-Smirnov), las comparaciones estadísticas entre los valores obtenidos antes y después de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas, se realizaron utilizando la prueba no paramétrica de Wilcoxon. El análisis de las diferencias entre ambos grupos de animales se realizó utilizando la prueba de la U de Mann-Whitney.

El nivel de significación para ambas pruebas estadísticas se fijó en una $p < 0,05$.

4,5,3- Análisis de las correlaciones y concordancia.

El estudio para determinar las correlaciones entre variables se determinó por la prueba de Spearman. Para el estudio de concordancia entre las técnicas de determinación de daño de *Procion orange* y fibronectina intracelular se utilizó un análisis de la concordancia, utilizando el método de Fleiss (ANOVA):

$$R_1 = (msS - msE) / [msS + msE + 2(msM)]$$

donde R_1 expresa la concordancia entre valores, msS el cuadrado de la media (varianza) debido a las diferencias entre muestras, msE el cuadrado de la media debida a los residuos de la varianza (error), y msM el cuadrado de la media debida a las diferencias entre los valores.

4,6- ASPECTOS ÉTICOS Y JURÍDICOS RELACIONADOS CON ESTE ESTUDIO.

Antes de diseñar el modelo experimental se tuvieron en cuenta todos los aspectos éticos relacionados con la utilización de animales de experimentación con fines experimentales científicos o educativos, con la finalidad de evitar algún tipo de dolor o sufrimiento injustificado, además de cualquier duplicación inútil de procedimientos de experimentación y para reducir al mínimo el número de animales utilizados contempladas en la Ley 5/1995, del 21 de junio, y publicada en el Boletín Oficial del Estado (B.O.E.) del jueves 10 de agosto de 1995: paginas 24935 – 24942.

El ámbito de aplicación del presente estudio queda justificado dentro de las regulaciones establecidas en el capítulo I, artículo 2 en los incisos: a2) y b). La utilización de perros raza *Beagle* fue necesaria para cumplimentar las exigencias del capítulo II, artículo 4), inciso a). A diferencia de otros estudios que utilizan animales vagabundos en otros medios y entornos jurídicos, la presente ley prohíbe utilizar estos animales. Los perros utilizados en este estudio se compraron y todos poseían la documentación adecuada expedida en su centro de cría. Estos animales fueron trasladados y mantenidos en la observancia de lo establecido en los capítulos II y III, y en cumplimiento de los artículos 5), 6), 7), 8) y 9) respectivamente como establece la citada ley.

La instrumentalización de los animales, así como la obtención de las biopsias antes y después de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas, siempre se realizó bajo los efectos de anestésicos, como se especifica en el correspondiente apartado de esta tesis doctoral. Los animales se mantuvieron continuamente monitorizados durante estos procedimientos para garantizar que no tuvieran sufrimiento o angustia. Una vez finalizado el período experimental, todos los animales fueron sacrificados, como se especifica en el correspondiente apartado de esta tesis doctoral y en cumplimiento de los reglamentos establecidos en el capítulo IV, artículo 14) de la ley.

Certificación: Ambos estudios contaron con la aprobación de los Comités Éticos respectivos de cada Institución (Hospital del Mar, Barcelona - Instituto Municipal de Investigaciones Médicas - Universidad Pompeu Fabra y Universidad del País Vasco), y están en concordancia con la legislación vigente autonómica, estatal y de la Unión Europea para la experimentación con animales de investigación.