

**DISCUSIÓN.**

Los resultados expuestos en este trabajo, que pasaremos a discutir a continuación, se pueden resumir en dos vertientes fundamentales.

- 1- Un resultado metodológico que contempla la valoración de la técnica de detección de acúmulos de fibronectina intracelular como una medida de daño de membrana.
- 2- Un resultado de aplicación que nos permite valorar los cambios inducidos en cuanto a “remodelación muscular”, inducción de daño de membrana y expresión de citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias, en los músculos respiratorios y no respiratorios del organismo, como consecuencia de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas crónicas de baja intensidad, similares a las que padecen pacientes con enfermedades obstructivas respiratorias.

#### **6,1- ESTUDIO 1.- VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE DETECCIÓN DE FIBRONECTINA INTRACELULAR, EN LA EVALUACIÓN DEL DAÑO DE MEMBRANA.**

Este estudio demuestra que, aunque las dos técnicas comparadas en nuestro trabajo se basan en diferentes principios biológicos, (una utiliza la difusión pasiva de una sustancia colorante de bajo peso molecular y, la otra utiliza el principio de reconocimiento antígeno-anticuerpo), sus resultados son muy similares.

La técnica de determinación de *Proción orange* está basada en la identificación de una sustancia con propiedades fluorescentes dentro de las fibras dañadas. Después de una inducción endovenosa del colorante éste entra en las fibras con disrupción de membrana a través de los pequeños poros que se forman en la membrana y las fibras que permiten la entrada del colorante son identificadas a través de un microscopio de epifluorescencia. Esto nos brinda una información cuantitativa y cualitativa de la permeabilidad del sarcolema.

El bajo peso molecular del *Procion orange* (PM 631) nos permite identificar fibras que presenten poros de membrana muy pequeños. Esto aumenta la sensibilidad de la técnica a la hora de determinar fibras dañadas. Sin embargo, esta técnica presenta varios inconvenientes: Primero, no puede ser utilizada en pacientes debido a la toxicidad del colorante. Segundo, tampoco se puede utilizar en modelos animales longitudinales en los que se desee cuantificar el porcentaje de fibras dañadas antes de comenzar el protocolo experimental.

La identificación de los acúmulos de fibronectina dentro de las fibras musculares utilizando anticuerpos específicos es uno de los métodos alternativos. Sin embargo, hasta la fecha no había sido validada frente a la técnica de referencia. La fibronectina es una proteína extracelular, que tiene la función principal de unir a través de sus receptores anclados en el plasmolema las fibras de colágeno a la fibra muscular, conformando con ello los espacios interfibrilares. Esta proteína no se encuentra dentro de la fibra muscular y, su identificación dentro de la misma indica que ella ha podido migrar hacia el interior a través de poros o interrupciones en el sarcolema.

Es posible hipotetizar que el daño detectable en la membrana de las fibras que presentan acúmulos de fibronectina tenga que ser de una magnitud mayor debido al elevado peso molecular de la proteína (aproximadamente 500 KD). Sin embargo, en nuestro estudio hemos encontrado que ambas moléculas marcan las mismas fibras al analizar cortes consecutivos del tejido. Nosotros suponemos que este hallazgo se puede deber a dos cosas. Por un lado, una vez que ocurre daño y la consecuente formación de poros en la membrana, estos poros serán de una dimensión tal que permitan entrar ambos tipos de moléculas al interior de la fibra. O, por otro lado, el daño producido en el músculo y la inflamación del tejido produzcan hidrólisis parciales de la molécula de fibronectina en los espacios interfibrilares para permitir la migración de células leucocitarias, y entonces, estos fragmentos producidos a partir de la hidrólisis de la fibronectina serán los que penetren a través de los poros presentes en la membrana. Sin embargo, sea cual sea la causa, ambas técnicas son capaces de identificar las mismas fibras con daño de membrana.

Por otro lado, la técnica inmunohistoquímica para cuantificar el daño de fibras musculares utilizando la detección de acúmulos de fibronectina intrafibrilar nos permite valorar el porcentaje de daño inicial y final que tienen el músculo, así como conocer si lo deseáramos, el porcentaje de fibras dañadas en diferentes momentos del modelo experimental solamente con realizar una biopsia del músculo.

Otras técnicas usadas para observar el daño de membrana en las fibras musculares, *in vivo* o *in vitro*, utilizan la determinación inmunohistoquímica de desmina, una proteína de localización intracelular de aproximadamente 55 KD de peso molecular. La salida de esta sustancia de las fibras musculares es también una inferencia de la presencia de poros en la membrana fibrilar. Otras determinaciones, como las mediciones de proteínas estructurales (ej. mioglobina, troponina I, fracciones de cadena pesada de miosina), del flujo enzimático (creatina quinasa o lactato deshidrogenasa), así como la detección de albúmina en el

citoplasma, pueden indicar la presencia de daño en la fibra muscular. Existen además otros marcadores como el Lanthanum (La<sup>3+</sup>), recaptación de peroxidasa, rutenio y tinción con trifluoperazina que se han utilizado para determinar el daño de membrana en las fibras musculares (West-Jordan, 1991; Crenshaw, 1994). Pero aunque algunas de estas técnicas mantienen su aplicación en la clínica, muchas han sido progresivamente abandonadas en investigación por diversos motivos.

Existe un creciente interés durante los últimos años en conocer el papel que desempeña el daño de sarcolema de las fibras en el proceso de remodelación muscular (Zhu, 1997; Goldspink, 1999). El daño de sarcómeras y de membrana fibrilar observado en los músculos esqueléticos después de la realización de ejercicios moderados, está descrito en la literatura (Zhu, 1997). Es importante destacar que estos fenómenos coexisten con otros procesos internos de la fibra muscular como la regulación positiva de los genes codificadores de las isoformas MyHC I, proteína miofibrilar esencial para la contracción muscular (Gea, 2000).

En este sentido puede haber dos explicaciones, el daño de membrana puede ser un prerequisite para el cambio, en cuanto a la expresión de los genes de miosina que codifican las diferentes isoformas, o puede ser un suceso no relacionado que ocurre simultáneamente (Gea, 1997). Sin embargo, hasta el presente, el papel que desempeña el daño del sarcolema en el proceso de remodelación es poco conocido. El conocimiento de esta relación entre el daño y los procesos de la remodelación muscular, puede tener implicaciones clínicas potenciales desde el punto de vista del entrenamiento y la rehabilitación.

En resumen, en este trabajo se ha demostrado que la determinación de fibronectina intracelular como medida de daño fibrilar es comparable a los resultados obtenidos en la técnica de determinación de *Procion orange* para el mismo fin. Y además, esta técnica de determinación de fibronectina intracelular nos permitiría determinar el daño en humanos, y conocer los porcentajes de daño inicial o intermedios en protocolos de investigación longitudinales, ambas cosas son imposibles con la técnica de *Procion orange*.

## **6,2- ESTUDIO 2. ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS INDUCIDOS EN LAS FIBRAS MUSCULARES COMO CONSECUENCIA DE LA APLICACIÓN DE CARGAS INSPIRATORIAS RESISTIVAS.**

No hemos encontrado en la bibliografía documentación alguna sobre valores morfológicos de las fibras de músculos respiratorios en los perros de raza Beagle. Tampoco existe mucha documentación sobre otros músculos, si tenemos en cuenta que son una de las pocas razas

permitidas para el uso en modelos experimentales caninos dentro de las normas vigentes de regulación de animales en la Comunidad Económica Europea, autonómica y estatal.

Es por esta razón que nos permitimos destacar, haciendo un breve paréntesis, los datos iniciales obtenidos en estos animales, con el fin de que puedan servir de referencia de los músculos estudiados en otros trabajos que utilicen modelos caninos similares al nuestro.

Los valores iniciales obtenidos en este trabajo en cuanto a la tipificación de fibras I y II, tamaño de las fibras I y II, porcentaje de isoformas de MyHC I y II, porcentaje de fibras híbridas y porcentaje de daño de membrana fibrilar, están obtenidos de todos los animales incluidos en el estudio al inicio en los tres músculos estudiados. Los valores morfométricos están determinados en tejido preservado en parafina lo que hace que sirvan de referencia o sean comparables con tejidos preservados de la misma forma (tabla resumen I. Pág. 78).

En todos los músculos estudiados predominan las fibras de tipo I sobre las fibras de tipo II. Sin embargo, el porcentaje de fibras tipo I más elevado lo tiene el músculo vasto interno. Los porcentajes relativos de ambas isoformas de MyHC se comportan de una manera similar a los porcentajes de los tipos de fibras. Esto es coherente dado que la isoforma predominante de MyHC es la que confiere las propiedades a las fibras. Esto se hace evidente cuando se tipifican las fibras por métodos inmunohistoquímicos utilizando los anticuerpos específicos contra cada isoforma de MyHC.

Como ya se ha señalado en el capítulo de resultados, los resultados obtenidos referentes a la composición fibrilar y la relación porcentual de las isoformas de MyHC son coherentes con los tipos de funciones que realizan estos músculos. El músculo vasto interno presenta más fibras tipo I, esto se debe probablemente a su función en la postura corporal y en la locomoción, y la relación entre ambas isoformas de MyHC es de 70:30. Mientras que la relación tipo I vs tipo II, en los músculos respiratorios, es de una proporción aproximada de 50:50. Esta distribución de isoformas de MyHC I y II es similar a la encontrada, en condiciones normales, en los mismos músculos en el hombre.

El tamaño de los tipos I y II de las fibras musculares son similares en el diafragma; sin embargo, en el músculo intercostal externo se aprecia un aumento significativo del tamaño de las fibras tipo II, mientras que en el vasto interno el aumento significativo se encuentra en el tamaño de las fibras I. Nosotros no esperábamos encontrar diferencias entre los músculos respiratorios, sin embargo, a pesar de que ambos músculos están descritos como

principales inspiratorios, es posible que en este animal (López de Silane, 1995), los intercostales externos tengan un papel más destacado durante la inspiración. De hecho se sabe que los intercostales son progresivamente reclutados en las situaciones que implican un aumento de la demanda (De Troyer, 1985, 1992 a y b; DiMarco, 1990; De Troyer y Farkas, 1994).

Los valores porcentuales obtenidos en este trabajo en cuanto a la cantidad de fibras que co-expresan las dos isoformas de MyHC (fibras híbridas) y fibras con daño de membrana son muy bajos en el momento inicial. Estos resultados son probablemente los que cabe esperar debido a los procesos de recambio de fibras que tiene lugar en el músculo esquelético (Orozco-Levi, 2001).

#### **6,2,1- Alteraciones en la permeabilidad de membrana como consecuencia de las cargas inspiratorias resistivas.**

Los músculos respiratorios comparten la característica con el resto de los músculos esqueléticos del organismo de responder modificándose ante un entrenamiento (Reid y Samrai, 1995; McCool y Tzelepis, 1995). A su vez los músculos respiratorios tienen una función fundamental para el organismo que es la de posibilitar el intercambio de gases esencial para la vida. Esta característica de los músculos respiratorios les confiere una importancia especial que hace necesarios todos los esfuerzos para esclarecer los mecanismos de daño y remodelación muscular que ocurren en dichos músculos al ser sometidos a cargas. Estas cargas respiratorias se hallan presentes en diferentes patologías respiratorias.

Estudios realizados para analizar los mecanismos de daño y recuperación de fibras musculares, así como la remodelación muscular en modelos experimentales han evidenciado que, después de producir contracciones mecánicas concéntricas (Fridén y Lieber, 1998), ejercicios con cargas variables (Lynn y Morgan, 1994), y contracciones provocadas durante estiramientos forzados pleiométricas o excéntricas (Komulainen, 1998), aparecen alteraciones en la célula dando lugar a diferentes fenómenos como: degeneración del citoplasma, disrupciones en las membranas del sarcolema, mitocondrias y retículo sarcoplasmático, desorganización de las miofibrillas (incluyendo roturas en las bandas Z, pérdida en la alineación de los miofilamentos, etc.), así como pérdida de desmina y otras proteínas del citoplasma (Fridén y Lieber, 1998). De igual forma se ha encontrado daño de las fibras musculares después de ejercicios en animales y en humanos (Armstrong, 1990; Evans y Cannon, 1991).

En estudios sobre patologías respiratorias, y patologías degenerativas del sistema nervioso y muscular también se han descrito daño y necrosis de las fibras musculares. Un número relativamente elevado de fibras musculares dañadas han sido observadas en músculos respiratorios de pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (Grassino, 1989; Hards, 1990; Orozco-Levi, 1994). Por otro lado, también se ha descrito la presencia de bandas de necrosis muscular en niños y adultos que fallecen por muerte súbita y pacientes que fallecen por un estatus asmático (Silver y Smith, 1992). Estas bandas están probablemente producidas por las sobrecargas inspiratorias que sufren estos pacientes.

Al igual que en los estudios anteriores, la aplicación de cargas resistivas inspiratorias en nuestro modelo experimental provocó un aumento en el daño de la membrana citoplasmática. El daño se evidenció significativamente en los tres músculos estudiados en los animales del grupo estudio. Este hecho nos hace postular que de una forma directa, como es en el caso de los músculos respiratorios, o indirecta como es en el caso del músculo periférico, la aplicación de cargas inspiratorias resistivas de intensidad moderada, está condicionando la aparición de daño en la membrana y modificaciones estructurales en las fibras musculares.

Las cargas aplicadas en nuestro estudio se pueden considerar como moderadas si analizamos los valores medios de presión traqueal ( $23,3 \pm 2$  cm H<sub>2</sub>O) obtenidos en los animales durante su aplicación, y si los comparamos con los reportados en otros trabajos experimentales también realizados en perros (Zhu, 1997). Estos autores tratando de desarrollar un modelo experimental agudo de obstrucción al flujo aéreo tenían cifras de presión traqueal equivalentes al doble de las que nosotros tenemos (Zhu, 1997); sin embargo, el porcentaje de fibras dañadas en los músculos respiratorios era algo menor al que nosotros reportamos en nuestros animales. Estas diferencias probablemente respondan a la duración de las cargas, a la diferencia entre la razas de perros utilizados (Komulainen, 1998; Fridén y Lieber, 1998) y al método de detección del daño empleado. De esta forma, los mecanismos de recuperación de la fibra muscular, así como la inducción de apoptosis, necrosis y muerte celular variarán en función de la magnitud y duración de las cargas. Este aspecto está poco estudiado y merecería una mayor atención, sobre todo, teniendo en cuenta aquellas patologías como la EPOC, apnea del sueño, etc., que de una forma crónica, y no aguda, someten a los músculos respiratorios a cargas moderadas o altas durante períodos largos de tiempo.

Las cargas inspiratorias aplicadas a los animales son el único agente causal que puede explicar la aparición de daño en estos animales. En los animales del grupo control no se aplicaron las cargas y se obtuvieron valores de daño similares a los expresados en las 1ª BIOPSIAS lo que descartó otros factores como la inflamación derivada de la traqueostomía o de la manipulación implícita a las primeras biopsias. Por otra parte, el porcentaje de daño basal no supera el 2% del total de las fibras de los músculos estudiados, resultados similares a los que obtuvieron Zhu y colaboradores (1997) utilizando la técnica de detección de *Procion orange* intracelular como marcador de daño.

En un análisis de los resultados experimentales tendríamos que enfocar el análisis de daño presente en los músculos estudiados en dos direcciones, analizando por separado los resultados obtenidos en los músculos respiratorios y en el vasto interno.

El daño presente en los músculos respiratorios es de una magnitud similar entre ellos y parece consecuencia directa de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas. Sobre estos músculos recae fundamentalmente la acción de incrementar la presión inspiratoria ante la presencia de las cargas. El daño ocasionado por las cargas inspiratorias pudiera ser el estímulo inicial en las fibras musculares para comenzar la remodelación a nivel molecular de dichas fibras con el objetivo de adaptarse a los cambios en la demanda funcional de los músculos ventilatorios. Sin embargo, también puede tratarse de fenómenos coexistentes pero no relacionados entre sí. Los resultados son paralelos a los descritos por Zhu (1997) ante cargas de alta intensidad (Zhu, 1997).

Este proceso de remodelación muscular se puede evidenciar también en el análisis posterior que de estos músculos hacemos teniendo en cuenta el resto de parámetros analizados en el presente estudio. Por otra parte, nuestros resultados son concordantes con estudios previos realizados en pacientes con diversas enfermedades respiratorias crónicas que evidencian la presencia de daño en los músculos respiratorios (Grassino, 1989; Orozco-Levi, 1994)

Por otro lado, parece indicar por los resultados obtenidos en nuestro trabajo, que la aplicación de cargas provoca como consecuencia indirecta que también se exprese daño en músculos que no están influidos directamente por éstas. Este hallazgo discrepa del trabajo de Zhu (1997) que no encontró aumento del daño de membrana en el músculo de las extremidades tras la aplicación de cargas (Zhu, 1997). Estos músculos, a su vez, se pueden ver afectados también por otros parámetros fisiológicos y/o etológicos condicionados indirectamente por las cargas. Entre estos, las variaciones del comportamiento general del

animal (el aumento del sedentarismo) (Tidball, 1995 a y b; St. Pierre y Tidball, 1994; Tidball y St. Pierre, 1996); o cambios derivados de procesos fisiológicos como los parámetros de intercambio de gases ( $\text{SaO}_2$  y  $\text{Pet CO}_2$ ) del animal u otras sustancias metabólicas circulantes derivadas de la inflamación, la inducción de apoptosis y/o necrosis fibrilar, entre otras (St. Pierre y Tidball, 1994).

El músculo periférico que, a nuestro juicio, no tiene una relación directa con las cargas inspiratorias aplicadas al perro puede sin embargo, recibir de forma colateral los efectos de estas cargas. En nuestro estudio se evidenció que se produce una disminución de la actividad física del animal que recibía cargas, aunque este parámetro no fue medido y sólo se basa en observaciones del personal que manipuló a los animales. Esta pudiera ser probablemente una de las causas de este deterioro en el músculo de las extremidades inferiores. Por otro lado, los músculos periféricos pudieran estar siendo influidos negativamente por procesos fisiológicos que se están llevando a cabo en la remodelación de los músculos que si están siendo estimulados o ejercitados, o procesos fisiológicos relacionados con la demanda energética y de síntesis de proteínas que tiene lugar también en los músculos “ejercitados” y necesitados de remodelación. Otras posibilidades a tener en cuenta sería que, el desarrollo de procesos inflamatorios condicionados por la aplicación de la cargas no se ve regulado negativamente en los músculos periféricos con la expresión de citocinas anti-inflamatorias, mientras que en los músculos respiratorios ocurre todo lo contrario con vista a preservar las funciones ventilatorias vitales del animal.

Otros mediadores como pueden ser la expresión de diversas citocinas, quimiocinas u otras sustancias relacionadas con la inflamación pueden estar moduladas por las cargas. Por ejemplo, analizando nuestros resultados, en el grupo estudio los animales experimentaron un aumento en la expresión de IL-10 como consecuencia de las cargas vs el grupo control que no presentó este aumento de la IL-10. Lo único que diferenciaba a ambos grupos fue la aplicación de las cargas inspiratorias resistivas. De la misma forma, pero en sentido opuesto, los animales del grupo control que no recibieron cargas, no presentaron aumento en la expresión de IL-10 que inhibiera los procesos inflamatorios y como consecuencia presentaban al final un aumento en la expresión de TNF- .

Sería de extraordinaria importancia establecer diseños experimentales que pudieran relacionar y concatenar en el tiempo los efectos de las cargas recibidas con los procesos de cambio, daño y expresión de citocinas inflamatorias o anti-inflamatorias que se dan en el músculo.

Analizando los resultados obtenidos en el vasto interno, se puede destacar, que el daño presente en este músculo es de una magnitud incluso mayor, que el encontrado en los músculos respiratorios. Este hecho apoya los resultados ya planteados por otros investigadores que hablan de la presencia de alteraciones sistémicas asociadas a los músculos periféricos, en pacientes que padecen enfermedades crónicas con cargas respiratorias resistivas (Hildebrand, 1991; Whitton, 1998). A esto se le ha denominado “efecto de transferencia muscular”.

Si tenemos en cuenta el comportamiento global del músculo periférico, vasto interno, con relación al resto de parámetros estudiados (concentración de isoformas de MyHC, tamaño de las fibras musculares), en este trabajo podemos destacar que la aplicación de cargas en una intensidad entre leve-moderada y por un período de tiempo de dos semanas de duración, produce pérdida de la masa muscular, una disminución en el tamaño de ambas tipos de fibras musculares, y una pérdida de las cantidades absolutas de ambas isoformas de MyCH en el músculo.

En resumen, el único agente causal posible, aunque indirecto de estas transformaciones son las cargas inspiratorias resistivas, ya que en los músculos periféricos de los animales del grupo control no se evidencian ninguna de estas variaciones.

Un efecto similar al que encontramos en el músculo periférico de estos animales después de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas lo encontramos también en los músculos periféricos de los pacientes con EPOC. En muchos momentos diferentes autores han llegado a plantear que existe, concomitantemente con la EPOC, una alteración sistémica que afecta a la musculatura periférica y condiciona el comportamiento social y la capacidad de ejercicio de los pacientes (Hildebrand, 1991; Whitton, 1998). Estos cambios que aparecen en la musculatura periférica de los pacientes con EPOC ocasiona sin duda, una disminución de la calidad de vida de los mismos.

Las sucesivas investigaciones que se han llevado a cabo con relación al estudio de los músculos periféricos en pacientes con EPOC apuntan, cada vez más, hacia el convencimiento de que, en realidad la alteración muscular esquelética forma parte de una enfermedad sistémica. En concreto, cada vez hay más evidencias de que existe una miopatía generalizada en estos pacientes que daría lugar a alteraciones estructurales, funcionales y metabólicas de los músculos esqueléticos (Committee of Resp. Str. And Fund.

Assemb. 1999). Las causas de esta miopatía presente en los enfermos con EPOC incluye la falta de actividad, pero también, el envejecimiento, la inflamación, el desequilibrio del sistema redox, los efectos de la comorbilidad y los fármacos utilizados (Gea, 2001).

La necesidad de realizar por separado el análisis de los músculos respiratorios del resto de los músculos esqueléticos concuerda con el enfoque que hace Reid y McGowan (1998) cuando analiza en su trabajo el daño en los músculos esqueléticos en general y por separado el análisis de los músculos respiratorios (Reid y McGowan, 1998).

En los músculos respiratorios el daño presente es mucho menor que el encontrado en el periférico. Y debemos destacar que ambos músculos respiratorios estudiados presentan un porcentaje de daño similar después de la aplicación de las cargas. Esto hace pensar que ambos músculos respiratorios están asumiendo la misma responsabilidad en la ventilación del animal frente a las cargas aplicadas. Por lo demás, si tenemos en cuenta el resto de los parámetros estudiados, como se verá posteriormente en el análisis de cada músculo por separado, en los músculos respiratorios está ocurriendo un proceso de cambio estructural a nivel proteico y morfológico que hacen pensar más en una remodelación del músculo que busca adaptarse a las nuevas demandas fisiológicas, impuestas por las cargas. Por ejemplo, en estos músculos no se observa una pérdida de la masa fibrilar y sí una transformación en la expresión de las isoformas de MyHC.

#### **6,2,2- Análisis de los cambios morfológicos y en la expresión de proteínas estructurales, en las fibras de los músculos estudiados.**

##### **MÚSCULO INTERCOSTAL EXTERNO.**

Los cambios inducidos en el intercostal externo, por la aplicación de cargas inspiratorias resistivas, consisten de forma general en una disminución en la cantidad absoluta de MyHC I, en cambios porcentuales salvo un incremento en el porcentaje de fibras híbridas. Esto indica que existe un cambio en las fibras que sólo expresan MyHC I a fibras que comienzan a expresar también progresivamente MyHC II.

Esta situación presente en el grupo estudio de los perros es similar a la descrita en estudios realizados en enfermos con EPOC. En estos pacientes se ha encontrado que el reclutamiento intermitente de alta intensidad del músculo intercostal externo provoca un cambio en la expresión de las isoformas de MyHC dirigido a aumentar la expresión de MyHC II (Satta, 1997), que se concreta en un mayor porcentaje de estas fibras (Aguar, 1995).

La disminución en la concentración de MyHC I que presenta este músculo en nuestros resultados sería aún más consistente si detectáramos también, concomitantemente con esta disminución, un aumento en la concentración de MyHC II. Esta aparente contradicción podemos analizarla teniendo en cuenta las cargas inspiratorias leves-moderadas a las que fueron sometidos los animales del grupo estudio para prolongarlas en el tiempo y simular una situación crónica obstructiva. De esta forma, estas cargas requerían del animal esfuerzos de los músculos intercostales externos de forma intermitente en el tiempo, pero de alta intensidad durante las sesiones de cargas (De Troyer, 1985, 1992a, 1992b; DiMarco, 1990; De troyer y Farkas, 1994).

Es debido a estas características crónicas reproducidas en el modelo experimental que, pudiera ser más lenta la síntesis proteica de MyHC II que la degradación proteica de MyHC I y/o la inducción de modificaciones proteicas. Estas peculiaridades pueden traer como resultado que se detecte con mayor sensibilidad y rapidez la pérdida de la MyHC I, dando paso al rápido papel fisiológico que comienza a desempeñar la MyHC II para evitar la fatiga muscular, sin que aún se pueda detectar el incremento de la MyHC II. Es posible que un estudio con una duración mayor en la aplicación de las cargas, pudiera esclarecer este comportamiento entre las isoformas de MyHC. Nosotros suponemos que en esas condiciones aumentaría significativamente la expresión de la MyHC II en las fibras musculares del músculo intercostal externo como ya se puede observar si analizamos el aumento significativo expresado en porcentaje de fibras híbridas presente en este estudio en el mismo músculo. Probablemente el paso siguiente daría lugar a la expresión neta de MyHC II por estas fibras que en este momento tienen una composición híbrida.

### **MÚSCULO DIAFRAGMA.**

El único cambio estructural significativo que hemos detectado en el músculo diafragma como respuesta a la aplicación de las cargas inspiratorias resistivas, correspondió a una significativa disminución en el tamaño de las fibras tipo I y II. Sin embargo, se puede destacar que, a excepción del perro número 1, cuyo diámetro inicial y final de las fibras tipo I es sensiblemente mayor y menor respectivamente al resto de las medias encontradas en los demás casos, los demás animales no presentaron cambios drásticos en cuanto al tamaño de las fibras antes y después de la aplicación de cargas. Si obviamos los valores de este

animal este parámetro no mostraría cambio significativo alguno entre los valores medios del diámetro menor de las fibras, antes y después de las cargas, en este músculo.

Los estudios realizados por Sánchez (1982), entre otros, describen que en el paciente con EPOC las fibras del diafragma se hacen mas pequeñas en la misma dirección que el estadio de la enfermedad aumenta. Sin embargo, valdría la pena revisar esta afirmación. Estudios realizados en nuestro grupo (Borrat, 2000) en el que se analizan los tamaños de las fibras del diafragma de más de 100 pacientes, no se llega a las mismas conclusiones que Sánchez y no se encuentra una disminución del tamaño de las fibras.

Estudios previos realizados en diafragmas de pacientes humanos refieren que, la obstrucción crónica al flujo aéreo, da lugar a un incremento en la proporción de MyHC I y una disminución de las MyHC II. En estos mismos estudios se observan cambios similares al analizar la distribución fibrilar, es decir, aumenta el porcentaje de fibras tipo I y disminuyen las II (Levine, 1997; Mercadier, 1998; Nguyen, 2000; Gea, 2001). Este incremento de las proporciones de MyHC I y fibras de contracción lenta representa el mecanismo adaptativo que le proporciona al diafragma una mayor resistencia a la fatiga frente a un aumento de las cargas respiratorias. Sin embargo, en nuestro trabajo, las cargas inspiratorias empleadas (leve-moderadas) a los animales del grupo estudio no parecen ser lo suficientemente altas o duraderas como para inducir cambios en un músculo tan especializado en su función como el diafragma. Es por ello, que de todos los músculos estudiados, el diafragma es el que menos variaciones presenta con relación a los parámetros estudiados. Este hecho nos hace suponer que no recae en el diafragma del perro la principal responsabilidad de crear los gradientes de presión necesarias para llevar a cabo la ventilación, con este nivel de cargas inspiratorias. Por otro lado, parecen ser los músculos intercostales externos del perro, los que reciben una mayor responsabilidad ventilatoria. Hay que recordar que ambos músculos están definidos como los principales músculos inspiratorios en el perro (López de Silanes, 1995). Esto nos lleva al convencimiento que, a este nivel de cargas utilizadas en nuestro estudio, el diafragma por su alta especialización y eficiencia funcional no se ve necesitado de inducir ningún proceso de remodelación de sus fibras, y se necesitarían cargas de mayor intensidad o de mayor duración para que la remodelación del diafragma ocurra (Zhu, 1997; Gea, 2000).

Gea (2000), analiza la expresión de los genes que codifican para las isoformas de MyHC en el diafragma de perros "*mongrel*" mediante la utilización de cargas inspiratorias resistivas. A estos animales se les aplicaron cargas inspiratorias resistivas más intensas y menos

duraderas que las del presente estudio ( 80 cm H<sub>2</sub>O/L/s; 2 h por día durante 4 días) simulando un modelo agudo de obstrucción al flujo aéreo (Gea, 2000). Los cambios detectados a nivel de la expresión de RNAm, por Gea, (2000) coinciden con los cambios a nivel proteico descritos por Levine, (1997), en pacientes con EPOC estable. Es decir, detectaron un incremento de la expresión de RNAm de la MyHC I, aunque no encontraron cambios significativos en cuanto a la expresión del RNAm de la isoforma rápida (MyHC II), y las proporciones entre ambas variaron.

En nuestro modelo experimental con un nivel de cargas inferior (15% de la PIM) pero más prolongado, no encontramos modificaciones: ni en la proporción, ni en la cantidad de ninguna de las MyHC estudiadas en los diafragmas de los animales del grupo estudio. Esto puede deberse, como se ha explicado antes, a que los niveles de carga utilizados en nuestro estudio no superan el umbral requerido por el músculo para desarrollar los mecanismos de remodelación muscular en la composición de las MyHC.

En resumen, la ausencia de cambios estructurales relevantes en el diafragma de los perros del grupo estudio pueden ser debidas básicamente a dos factores: a) que las cargas resistivas aplicadas a los perros no sean lo suficientemente intensas y/o duraderas como para inducir cambios de este tipo en este músculo; b) Aunque el diafragma es en el hombre el principal músculo inspiratorio, su contribución en la respiración del perro es menor o se ve menos comprometida en establecer los gradientes de presión necesarios en la ventilación bajo cargas ligeras-moderadas.

### **MÚSCULO VASTO INTERNO**

La aplicación de cargas inspiratorias resistivas en los perros del grupo estudio da lugar a una disminución significativa en las cantidades de MyHC I y II. Sin embargo, la distribución de los porcentajes se mantuvo estable.

La técnica de ELISA nos permite analizar las variaciones que tiene cada isoforma por separado en el tejido, independientemente de las proporciones que éstas tengan. Este análisis nos brinda una información precisa de si el músculo analizado está experimentando una remodelación de su composición (aumento de una isoforma sobre la otra) o un deterioro de la masa muscular (disminución de una o ambas isoformas).

El análisis de nuestros resultados en el vasto interno de los perros estudiados nos induce a pensar que lo que ha ocurrido a los animales como consecuencia de la aplicación de las

cargas inspiratorias resistivas, es una situación de pérdida de su masa proteica y por tanto una atrofia del músculo.

Conjuntamente con el análisis anterior y apoyando el mismo, se puede observar en este músculo, una disminución significativa de los valores medios de los tamaños de las fibras tipo I, así como una tendencia a la disminución de este mismo parámetro, que no llega a ser significativa en los valores obtenidos de las fibras tipo II.

Se puede explicar el incremento significativo en el porcentaje de fibras híbridas en este músculo, teniendo en cuenta el incremento de la MyHC II en fibras que antes solo expresaban MyHC I. Esto indica que se está produciendo un cambio en el músculo de fibras tipo I a tipo II, y por ello está disminuyendo el número de fibras que expresan mayoritariamente isoformas de MyHC I.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran, por tanto, que la aplicación de cargas inspiratorias resistivas a los perros dan lugar a importantes cambios estructurales en el vasto interno de dichos animales. Resumiendo, podemos decir que: 1) existe una reducción del número y diámetro de fibras tipo I, así como una disminución de la concentración de la isoforma de MyHC I; 2) en cuanto a las fibras tipo II, se mantiene una proporción similar de fibras puras, pero hay un incremento en la proporción de fibras híbridas que expresan ambas isoformas de MyHC; 3) Los diámetros de las fibras tipo II tienden a disminuir (aunque no de forma significativa). En su conjunto estos resultados nos hacen pensar que a este nivel de carga ya se producen cambios que indican atrofia muscular y una disminución de la capacidad oxidativa de estos músculos.

Como en el caso del daño de membrana, los cambios observados en este músculo pueden ser atribuidos, principalmente, a tres factores: el decondicionamiento (como consecuencia de la inactividad producida por las cargas ó el cambio de ambiente), la baja disponibilidad de oxígeno que se produce en los perros como consecuencia de la aplicación de las cargas inspiratorias resistivas, y/o el estrés a que se ven sometidos los animales como consecuencia de las cargas.

El decondicionamiento se ha estudiado por diferentes autores en distintos modelos animales incluyendo: suspensión de las extremidades, inmovilización física, el descanso prolongado en cama y la exposición a ambientes de ingravidez. La principal consecuencia fenotípica del decondicionamiento es la atrofia muscular. Esta atrofia se debe principalmente a una

disminución del tamaño y del contenido proteico de las fibras musculares (Booth y Gollnick, 1983; Thomason y Booth, 1990; Booth y Kirby, 1992; Campione, 1993). Estos resultados son compatibles con los encontrados en nuestro estudio a niveles de cargas inspiratorias leve-moderadas.

Otros cambios descritos que se producen durante el proceso de adaptación son el cambio de fibras de contracción lenta (tipo I) a fibras de contracción rápida (tipo II) (Häggmark, 1986; Veldhuizen, 1993); así como un aumento en la proporción de isoformas de MyHC II (Campione, 1993; Caiozzo, 1996). Estas observaciones apoyan la hipótesis postulada por Caiozzo, (1996) en la que plantea que la inactividad hace a los músculos más rápidos (Caiozzo, 1996).

Otros estudios, pero en este caso realizados en pacientes que padecen EPOC, aportan evidencias de que la hipoxemia que sufren estos pacientes puede ser uno de los factores que contribuyen a incrementar la proporción de fibras tipo II en el cuádriceps humano (Hildebrand, 1991). Sin embargo, otros autores resaltan que la dificultad de separar, en estos pacientes, los efectos de la hipoxemia de los de la inactividad física, no deja clara cual puede ser la verdadera causa de este cambio (Whitton, 1998). La ausencia de desaturaciones importantes en nuestros animales apuntan a que este factor no fue determinante en nuestro estudio. Sería necesario, no obstante, desarrollar modelos experimentales específicos encaminados a esclarecer el o los responsables de los cambios en los músculos periféricos frente a cargas obstructivas respiratorias. Este aspecto pudiera contribuir grandemente a mejorar los síntomas producidos por las enfermedades obstructivas crónicas y la calidad de vida de estos pacientes.

En nuestro estudio nosotros inferimos que la disminución de la actividad condicionada por las cargas son las responsables de los cambios encontrados en este músculo. Otros factores como pudieran ser el cambio de ambiente o la traqueostomía también estuvieron presentes en el grupo control y en este grupo no se evidenciaron estos cambios.

En resumen, los cambios observados en el vasto interno de los perros del grupo estudio como consecuencia de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas están en consonancia con, los cambios adaptativos descritos en respuesta a diversos modelos experimentales de inactividad física, así como con los cambios detectados en el cuádriceps de pacientes con EPOC.

### **6,2,3- Valoraciones de los cambios obtenidos en las citocinas: inflamatoria (TNF- $\alpha$ ) y anti-inflamatoria (IL-10).**

Las citocinas inflamatorias (IL-1 y TNF- ) se han encontrado mediando parte del daño de tejidos después de una isquemia o infecciones (Engles, 1997; Chang y Bistran, 1998), y también después del desarrollo de ejercicios intensos y prolongados (Brenner, 1999). Hay evidencias del aumento de expresión de otras citocinas como la IL-6 y la IL-10 en músculos esqueléticos después de ejercicios prolongados (Ostrowski, 1998 a y b; Suzuki, 2000; Pedersen, 2000).

En modelos animales de ratones “*knockout*” (-/-) para IL-10 se observó un aumento de los niveles de TNF- en el músculo *soleus* después de provocar la isquemia. En este músculo los niveles de TNF- que habían aumentado disminuían si se les suministraba a los ratones IL-10 exógena. Estos autores comprobaron que la administración de IL-10 exógena reducía los niveles de daño en las fibras (Engles, 1997). En los estudios de Engles, 1997, reafirma experimentalmente el papel regulador negativo que tiene el IL-10 sobre la expresión de TNF- (Engles, 1997).

Si analizamos la concordancia de TNF- vs IL-10 obtenidos en los músculos respiratorios en nuestros valores experimentales, podemos observar que la estimulación de la expresión de IL-10 debida a las cargas inspiratorias resistivas regula de forma negativa la expresión de TNF- . Así, los valores medios encontrados de la expresión de TNF- no varían después de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas lo que se contrapone con el aumento de la expresión de esta citocina en el grupo control. En el grupo control, se puede observar un aumento considerable, en todos los músculos estudiados, de los valores de TNF- que triplica, en todos los casos, el valor inicial (tablas XI, XII y XIII. págs. 107, 108, 109).

Este hallazgo sugiere que el aumento en la expresión de TNF- está condicionado por factores derivados de la manipulación invasiva a la que se sometieron los animales durante la realización de la traqueostomía. La aplicación de cargas inspiratorias resistivas contrarrestaría con éxito estos efectos. Los procesos inflamatorios inducidos por la manipulación quirúrgica del animal, a nuestro juicio, son responsables del aumento de la expresión de TNF- en los animales del grupo control. Esto está en concordancia con lo planteado por otros autores sobre el aumento de citocinas pro inflamatorias en los procesos relacionados con daño e inflamación (Brenner, 1999).

Los valores de IL-10 se ven aumentados significativamente dentro del grupo estudio en los músculos respiratorios que están siendo influidos directamente por la aplicación de las cargas inspiratorias. Esto nos hace pensar que la expresión del gen de la IL-10 se estimula de forma directa como consecuencia de las cargas inspiratorias resistivas. Si tenemos en cuenta que en ninguno de los músculos estudiados de los animales del grupo control se observan cambios significativos en la expresión de IL-10 podemos afirmar que las cargas inspiratorias son el agente responsable de la estimulación para la producción de IL-10.

El aumento de la IL-10 está involucrado en uno o más procesos fisiológicos del animal como mecanismo defensivo para tratar de preservar el músculo. Este aumento de la expresión de IL-10 se ha visto reflejada en otros estudios experimentales inducida por el ejercicio, el trauma y la isquemia. Silvestre, (2000) estudiando la isquemia y la modulación de los procesos inflamatorios derivados de la misma en músculos de ratones “*knockout*” que no tenían la capacidad de expresar IL-10 o expresarla (IL-10 (+/+), encontraron que el aumento de expresión de IL-10 inhibe el aumento de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). O sea, que el efecto anti-angiogénico de la IL-10 probablemente juega un papel en el balance de los procesos inflamatorios a través de la inhibición del VEGF (Silvestre, 2000).

Estudios realizados en corredores de Maratón y en otras disciplinas deportivas han puesto de manifiesto que, después de una sobrecarga de ejercicio, los atletas presentaban daño muscular y aparecían elevados los niveles de IL-10, IL-6, IL-8 (Suzuki, 2000; Pedersen, 2000). Por otro lado, en un estudio realizado sobre los efectos producidos por la administración de endotoxinas, se encontró en el diafragma de ratas, que la administración de IL-10 exógena previene el deterioro del músculo e inhibe la producción local de óxido nítrico (Taneda, 1998).

En estudios realizados en cultivos de células musculares, diferentes autores han descrito que tanto el TNF- $\alpha$  como la IL-10 son expresadas por éstas, así como también pueden expresar las fibras los receptores para ambas citocinas (Li, 1998; Kuru, 2000; De Rossi, 2000). Sin embargo con el análisis de nuestros resultados experimentales no podemos determinar si los RNAm de TNF- $\alpha$  ó IL-10 (en el caso de los animales del grupo control o del estudio respectivamente) están siendo producidos por las propias fibras musculares o llegan al músculo por vía sistémica. Sería importante determinar en futuros diseños experimentales si estos RNAm llegan al músculo o son expresados por él. Nosotros nos inclinamos a pensar que este aumento de la expresión de TNF- $\alpha$  y IL-10 se están produciendo en el mismo

músculo, si tenemos en cuenta la importante acción autocrina y paracrina de las citocinas. En este sentido se está realizando en este momento un trabajo complementario en nuestro grupo para determinar mediante la técnica de hibridación "*in situ*" si existe un aumento de la expresión de los RNAm para estas citocinas en las fibras musculares.

De todas formas, cualquiera que sea la procedencia de estas citocinas en la biopsia, sí se pueden analizar las consecuencias positivas o negativas que puede tener para el músculo, ya que la única diferencia que existe entre el grupo de estudio y el grupo control es el entrenamiento de los músculos respiratorios a través de las cargas inspiratorias resistivas. El aumento de la expresión de IL-10 protegería al músculo y, de alguna forma, lo condiciona para una remodelación estructural para hacer frente a las nuevas necesidades ventilatorias, como se puede observar en el análisis de los otros parámetros musculares estudiados que se han discutido ya en este capítulo.

Es importante tener en cuenta que, ya a un nivel de carga leve-moderada este aumento en la expresión del IL-10 también se ha reflejado en el músculo periférico, donde hay una marcada tendencia al aumento de esta citocina ( $p=0,06$ ) (tabla XIII y en la figura 21a. págs. 110 y 111). Este aumento de la IL-10 en la musculatura que se está entrenando envía, presumiblemente, un tipo de señal sistémica a otros músculos del organismo "efecto de transferencia". Y esta señal pudiera inducir el aumento de la expresión de RNAm que codifica para IL-10 en estos músculos aunque ellos no estén directamente involucrados en el esfuerzo ventilatorio.

Por otro lado, en pacientes con EPOC se ha observado que los niveles altos de TNF- en suero se correlacionan directamente con la pérdida de masa grasa y muscular (Yamamoto, 1997). Takabatake, (2000) ha encontrado que la hipoxemia sistémica presente en pacientes con EPOC está asociada con la activación de TNF- y, este aumento, puede contribuir a la pérdida de peso en estos pacientes (Takabatake, 2000 a y b). Cabe destacar que en un estudio realizado por Creutzberg, (2000) en el que se suplementa con una dieta alta en calorías durante 8 semanas a los pacientes que padecen EPOC, no se produce un incremento del peso en estos pacientes. Estos autores concluyen que, la no respuesta de estos pacientes con EPOC a la sobrealimentación calórica está relacionada con la edad, la presencia de anorexia y una elevada respuesta sistémica inflamatoria (Creutzberg, 2000). En otros estudios realizados en ratas, a las que se les administró IL-1 y TNF- , se comprobó que se producía una pérdida de peso, aumento del catabolismo de las proteínas del músculo y aumento del peso del hígado (Ling, 1997).

El TNF- $\alpha$  activa la transcripción del factor nuclear kappa B (NF-KappaB) que es un mediador del desarrollo de la caquexia en el músculo (Guttridge, 2000). Está probado además que el TNF- $\alpha$  inhibe la proliferación, diferenciación y supervivencia de mioblastos de ratón en cultivo. Este efecto tiene lugar mediante la inhibición del factor de crecimiento de la insulina y el factor de crecimiento de la insulina unido a la proteína-5, sistemas esenciales para la proliferación y supervivencia de los mioblastos. Estos autores suponen que la sobreexpresión de TNF- $\alpha$  *in vivo* puede tener un comportamiento similar y estar por ello asociado con la caquexia (Meadows, 2000). Los estudios realizados por Greiwe (2001) demuestran que la expresión de TNF- $\alpha$  aumenta con la edad y esta proteína está relacionada con la pérdida de masa muscular. Estos autores también demuestran que en los pacientes que realizan ejercicio disminuye la expresión de TNF- $\alpha$  en el músculo (Greiwe, 2001). Estos resultados obtenidos por Greiwe (2001) apoyan los resultados expuestos en este trabajo.

Estudios realizados en un modelo experimental, en ratas, para producir fallo cardíaco evidenciaron un aumento de la expresión de TNF- $\alpha$  en músculos “rápidos” (*tibialis anterior*) en la misma medida en que aumentaban los procesos apoptóticos en este músculo. Sin embargo, esto mismo no se evidenció en el músculo lento (*soleus*) donde no se observaron síntomas de atrofia. Estos autores concluyeron que la apoptosis y el aumento de TNF- $\alpha$  se desarrollan más rápidamente en los músculos “rápidos” que en los “lentos” (Libera, 1999). Estos resultados infieren que es necesario observar el comportamiento de la expresión de una misma citocina en diferentes músculos, pues las variaciones en la expresión de estas moléculas no tienen porque ser las mismas en todos los músculos ante un mismo efecto externo.

En pacientes con EPOC también se ha observado un aumento de los niveles de TNF- $\alpha$  en suero sanguíneo (Yasuda, 1998; Takabatake, 1999), así como un aumento de las fibras apoptóticas en los músculos esqueléticos (Yasuda, 1998). Ambos procesos pueden estar relacionados con el desarrollo de la enfermedad, así como el aumento de la expresión de otra citocina inflamatoria, la IL-6 en estos pacientes (Yasuda, 1998).

¿Las variaciones, en los músculos esqueléticos de pacientes con EPOC, en cuanto a, la expresión de TNF- $\alpha$ , la inflamación, la apoptosis, entre otros, pudiera ser la causa o la consecuencia, del deterioro muscular y/o de la disminución en la actividad física de estos pacientes y por ende de su calidad de vida?. Estos mecanismos y sus interrelaciones aún no

han sido esclarecidos. A la inversa, ¿Pudiera ser que la actividad física prevenga los efectos adversos de la producción de TNF- en pacientes con EPOC?. Nuestros resultados así lo sugieren, mediado por un incremento en la expresión de IL-10

Dado el papel regulador que tiene la IL-10 sobre la expresión de TNF- y otras citocinas pro-inflamatorias y, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio, el “entrenamiento” de los músculos respiratorios induciría un aumento en la expresión de IL-10. A su vez, inducir el incremento de los niveles de expresión de esta citocina podría frenar el deterioro muscular y actuar a favor de una remodelación estructural y funcional de los músculos respiratorios que redundaría en un mejoramiento de su función.

De igual forma, estos resultados sugieren dirigir esfuerzos hacia el estudio de este tipo de marcadores en el músculo periférico en cuanto a su acción y sus mecanismos de expresión. De esta forma, podríamos conocer las variaciones en la expresión, así como los mecanismos de acción de estos indicadores en diferentes músculos esqueléticos. El esclarecimiento de las vías de estimulación y acción de las citocinas involucradas en los procesos inflamatorios en el músculo periférico puede explicar la sintomatología general de pacientes con enfermedades obstructivas crónicas, y por otro lado, puede determinar los tipos e intensidad de los ejercicios adecuados (tanto respiratorios como generales), que coadyuvaría a mejorar la función respiratoria de estos pacientes y con ello su calidad de vida.

No obstante, a la hora de extrapolar los resultados obtenidos de estas citocinas en modelos experimentales a pacientes que padecen enfermedades obstructivas respiratorias habría que tener en cuenta también, la gran heterogeneidad que presentan estos pacientes con relación a otros factores como el tabaquismo (fumadores o ex-fumadores) y el grado de actividad, la edad y la nutrición.

**CONCLUSIONES.**

Una vez valorados los resultados anteriormente expuestos se puede llegar a las siguientes conclusiones:

- 1- La técnica inmunohistoquímica para la detección de fibronectina intracelular nos permite valorar la presencia de daño de la membrana fibrilar con la misma fiabilidad que la técnica “*gold estándar*” de difusión del colorante *Procion orange*.

La ventaja que nos proporciona la técnica de detección de fibronectina con respecto a la técnica del *Procion orange* es la posibilidad de valorar la magnitud del daño en un modelo experimental antes y después de la aplicación de un protocolo de investigación. También puede permitir la valoración del daño de membrana en seres humanos, con o sin enfermedad respiratoria.

- 2- La aplicación de cargas inspiratorias resistivas leve-moderadas, producen daño de la membrana fibrilar de forma significativa. El daño no sólo aparece en los músculos respiratorios que participan de forma directa en la función ventilatoria del animal, si no que también, aparece como efecto de transferencia a los músculos periféricos.

- 3- Las cargas inspiratorias resistivas de intensidad leve-moderadas producen otros cambios estructurales en los músculos respiratorios:

En el **músculo intercostal externo** aparece un incremento significativo de las fibras híbridas, que coexpresan ambas isoformas de MyHC. En este músculo encontramos, además, una disminución de la concentración de la isoforma de MyHC I.

En el **músculo diafragma** la ausencia de cambios estructurales en los principales parámetros analizados en el presente estudio sugiere que la intensidad de las cargas inspiratorias resistivas aquí aplicadas no supera el umbral necesario para inducir los cambios.

Las cargas inspiratorias resistivas de intensidad leve-moderada producen también cambios estructurales significativos en los músculos no implicados en la ventilación:

En el **músculo periférico** la aplicación de las cargas inspiratorias resistivas de intensidad leve-moderada inducen un proceso de sarcopenia. Este proceso se

constata por una disminución del diámetro menor de ambos tipos de fibras, así como una disminución de la concentración de las dos isoformas de MyHC. Además, se produce un cambio de fibras de contracción lenta (tipo I) a fibras de contracción rápida (tipo II) que se constata por el incremento de fibras tipo I que comienzan a sintetizar isoformas de MyHC II.

- 4- La aplicación de las cargas inspiratorias resistivas actúan directamente sobre la remodelación o adaptación muscular. Este proceso se acompaña de un incremento de la expresión de IL-10, citocina que inhibe los procesos inflamatorios y preserva el músculo. Por el contrario, en los animales que no recibieron cargas, no se produjo una regulación positiva de IL-10, y se observó un incremento en la expresión de TNF .

Estos resultados sugieren que la actividad tiene un papel importante en la preservación del músculo esquelético, y lo hace entre otros mecanismos, a través de la expresión de mediadores anti-inflamatorios como la IL-10.

# **BIBLIOGRAFÍA**

1. **Acker M.**, Mannion J. y Brown W. Canine diaphragm muscle after 1 year of continuous electrical stimulation: its potential as a myocardial substitute. *J. Appl. Physiol* 1987; 62: 1264 – 1270.
2. **Aguar C.** Estructura y función de los músculos respiratorios en la EPOC: Desarrollo de un modelo de biopsia ambulatoria. 1995. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
3. **Andersen J.L.**, Klitgaard H. y Saltin B. Myosin heavy chain isoforms in single fibres from m. vastus lateralis of sprinters: influence of training. *Acta Physiologica Scandinavica* 1994; 151: 135 – 142.
4. **Armstrong R.B.** Initial events in exercise-induced muscular injury. *Medicine and science in sports and exercise* 1990; 22: 429 - 435
5. **Arora N.S. y Rochester D.F.** Effect of body weight and muscularity on human diaphragm muscle mass, thickness and area. *J. Apply Physiol* 1982; 52: 64 70.
6. **Bisschop A.**, Gayan-Ramirez G., Rollier H., Gosselink R., Dom R., de Bock V. Y Decramer M. Intermittent Inspiratory muscle training induces fiber hypertrophy in rat diaphragm. *Am. J. Crit Care Med.* 1997; 155: 1583 –1589.
7. **Blanco L.**, Pastó M., Gea J., Cabezas O., Palomeque J. y Broquetas J. Capacitat oxidativa del diafragma costal en pacients amb MPOC. *Ann Med* 1999; 82: S18.
8. **Bloom W and Fawcett D.W.** Tejido muscular. En: *A textbook of Histology*. Ed. Saunders Company.. Barcelona, 12<sup>a</sup> Edición. Ed. Labor, 1996; pp 291 – 335.
9. **Booth F.W. y Gollnick P.D.** Effects of disuse on the structure and function of skeletal muscle. *Med Sci. Sports Exerc* 1983; 15 : 415-420.
10. **Booth F.W. y Kirby R.K.** Changes in skeletal muscle gene expression consequent to altered weight bearing. *Am. J. Physiol* 1992; 262 : R329 - R332.
11. **Borrat X.**, Orozco-Levi M., Masdeu MJ., Mendez R., Barreiro E. y Gea J. Controversias derivadas del metaanálisis sobre el tamaño de las fibras del diafragma en pacientes con EPOC. *Arch Bronconeumol* 2000; 36: 13.
12. **Brenner I.K.**, Natale V.M., Vasiliou P. Moldoveanu A.I. Shek P.N. y Shephard R.J. Impact of three different types of exercise on components of the inflammatory response. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology* 1999; 80: 452 – 460.
13. **Brooke M.H. y Kaiser K.K.** Muscle fiber types: How many and what king?. *Arch Neurol* 1970; 23: 369
14. **Buhling F.**, Tholert G., Kaiser D., Hoffmann B., Reinhold D., Ansorge S. y Welte T. Increased release of transforming growth factor (TGF)-beta1, TGF-beta2, and chemoattractant mediators in pneumonia. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 1999; 19: 271 - 278.
15. **Burke R.E.**, Levine D.N., Tsairis P. y Zajac F.E. Physiological types and histochemical profiles in motor units of the gastrocnemius. *J. Physiol* 1973; 234: 723 - 748.

16. **Burnet H.**, Lenoir P. y Jammes Y. Changes in respiratory muscle activity in conscious cats during experimental dives at 101 ATA. *Journal of Applied Physiology* 1992; 73: 465 - 472.
17. **Butler C.** Diaphragmatic changes in emphysema. *American Rev Res Dis* 1976; 114: 155 - 159.
18. **Byrd S.K.**, Bode A.K. y Klug G.A. Effects of exercise of varying duration on sarcoplasmic reticulum function. *J. Appl. Physiol.* 1989 (a); 66:1383 - 1388.
19. **Byrd S.K.**, McCutcheon L.J., Hodgson D.R. y Gollnick P.D. Altered sarcoplasmic reticulum function after high-intensity exercise. *J. Appl. Physiol* 1989 (b); 67: 2072 – 2077.
20. **Byrd S.K.** Alterations in the sarcoplasmic reticulum: a possible link to exercise-induced muscle damage. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 1991; 24: 531 – 536.
21. **Caiozzo V.J.**, Haddad F., Baker M.J., Herrick R.E., Prietto N. and Baldwin K.M. Microgravity-induced transformation of myosin isoforms and contractile properties of skeletal muscle. *J. Appl. Physiol* 1996; 81 : 123 –132.
22. **Campione M.**, Ausoni S., Guezennec C.Y and Schiaffino S. Myosin and troponin changes in rat soleus muscle after hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol* 1993; 74: 1156 -1160.
23. **Casadevall C.**, Gea J., Palacio J., Barreiro E., Orozco-Levi M. y Broquetas J. Upregulation of the gene encoding the Myosin Heavy Chain –I (MyHC-I) in the diaphragm of COPD patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: A147.
24. **Celada A.** *Inmunología Básica*. Novena Edición. Ed. Labor S.A. Escoles Pies. Barcelona, 1994
25. **Chandel N.S.**, Trzyna W.C., McClintock D.S., y Schumacker P.T. Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *Journal of immunology* 2000; 165: 1013 – 1021.
26. **Chang H.R. y Bistrain B.** The role of cytokines in the catabolic consequences of infection and injury. *Journal of parenteral and enteral nutrition* 1998; 22: 156 – 166.
27. **Cheema I.R.**, Hermann C., Postell S. y Holifield B. Effect of tumour necrosis factor-alpha on total myofibrillar and sarcoplasmic protein synthesis and polysomal aggregation in rat skeletal muscles. *Cytobios* 1999; 97: 133 - 139.
28. **Cheema I.R.**, Hermann C., Postell S. y Barnes P. Effect of chronic excess of tumour necrosis factor-alpha on contractile proteins in rat skeletal muscle. *Cytobios* 2000; 103: 169 - 176.
29. **Chyczewska E.**, Mroz R.M. y Kowal E. TNF-alpha, IL-1 and IL-6 concentration in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of non-small cell lung cancer (NSCLC). *Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku* 1997; 42 (Suppl 1): 123 -135.

30. **Clarkson P.M.**, Nosaka K. y Braun B. Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 1992; 24: 512 - 520.
31. **Creutzberg E.C.**, Schols A.M., Weling-Scheepers C.A., Buurman W.A. y Wouters E.F. Characterization of nonresponse to high caloric oral nutritional therapy in depleted patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2000; 161: 745 – 752.
32. **Criner G.J.**, Muza S.R. y Kelsen S.G. Respiratory action of the canine deep pectoral muscles. *Respiration Physiology* 1994; 98: 43 - 51.
33. **Crenshaw A.G.**, Thornell L.E., y Friden J. Intramuscular pressure, torque and swelling for the exercise-induced sore vastus lateralis muscle. *Acta Physiol Scand* 1994; 152: 265 – 277.
34. **De Letter M.A.**, van Doorn P.A., Savelkoul H.F., Laman J.D., Schmitz P.I., Op de Coul A.A., Visser L.H., Kros J.M., Teepen J.L. y van der Meche F.G. Critical illness polyneuropathy and myopathy (CIPNM): evidence for local immune activation by cytokine-expression in the muscle tissue. *Journal of Neuroimmunology* 2000; 106: 206 - 213.
35. **De Rossi M.**, Bernasconi P., Baggi F., de Waal Malefyt R. y Mantegazza R. Cytokines and chemokines are both expressed by human myoblasts: possible relevance for the immune pathogenesis of muscle inflammation. *International Immunology* 2000; 12: 1329 - 1335.
36. **De Troyer A.**, Kelly S., Macklem PT. Mechanics of intercostal space and action of external and internal intercostal muscle. *J. Clin Invest* 1985; 75: 850 – 895
37. **De Troyer A.** The electro-mechanical response of canine inspiratory intercostal muscle to increased resistance: the cranial rib.cage. *Journal of Physiology* 1992 (a); 451: 445 - 461.
38. **De Troyer A.** The electro-mechanical response of canine inspiratory intercostal muscle to increased resistance: the caudal rib.cage. *Journal of Physiology* 1992 (b); 451: 463 - 476.
39. **De Troyer A. y Farkas GA.** Contribution of de rib cage inspiratory muscles to breathing in baboons. *Respir Physiol* 1994; 97: 135 – 145.
40. **De Troyer A.** Role of joint receptors in modulation of inspiratory intercostal activity by rib motion in dogs. *Journal of Physiology* 1997; 503: 445 – 453.
41. **Dempsey J.A.**, Harms C.A. y Ainsworth D.M. Respiratory muscle perfusion and energetics during exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 1996; 28: 1123 – 1128.
42. **Desphande S.S.**, Adler M. Y Sheridan R.E. Differential actions of brevetoxin on phrenic nerve and diaphragm muscle in the rat. *Toxicon* 1993, 31: 459 - 470.

43. **Di Francia M.**, Barbier D., Mege J.L. y Orehek J. Tumor necrosis factor-alpha levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1994; 150: 1453 - 1455.
44. **Di Marco A.**, Romaniuk JR., Supinski GS. Paraesternal and external intercostal shortening during eupneic breathing. *J Appl Physiol* 1990; 60: 2222 - 2226.
45. **Dinarello C.A.** The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. *New England Journal of Medicine* 2000(a); 343: 732 - 734.
46. **Dinarello C.A.** Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000(b); 118: 503 - 508.
47. **Dooth G.K. y Perry S.V.** Distribution of polymorphic forms of troponin components and tropomyosin in skeletal muscle. *Nature* 1979; 278: 714 - 718.
48. **Dubowitz V.** *Muscle biopsy: A practical approach.* 1985. Ed. Bailliere Tindall. London.
49. **Elton C.**, Rahim A., Youl B., Goldspink G. y Winslet M. Intercostal muscles in the rabbit: surgical anatomy and flap construction. *Laboratory Animals* 1998; 32: 422 - 426.
50. **Engel W.K.** The essentiality of histo- and cytochemical studies of skeletal muscles in the investigation of neuromuscular disease. *Neurology* 1962; 12: 778.
51. **Engles R.E.**, Huber T.S., Zander D.S., Hess P.J., Welborn M.B., Moldawer L.L. y Seeger J.M. Exogenous human recombinant interleukin-10 attenuates hindlimb ischemia-reperfusion injury. *Journal of Surgical Research* 1997; 69: 425 - 428.
52. **Espat NJ.**, Copeland EM., Moldawer L. Tumor necrosis factor and cachexia: a current perspective. *Surgical oncology* 1994; 3: 255 - 62.
53. **Evans W.J., y Cannon J.G.** The metabolic effects of exercise-induced muscle damage. *Exercise and sport sciences reviews* 1991; 19 : 99 - 125.
54. **Fleckenstein A.** Specific inhibitors and promoters of calcium action in the excitation-contraction coupling of heart muscle and their role in the prevention or production of myocardial lesions. In: *Calcium and the Heart.* P. Harris and L. H. Opie (Eds.) London: Academic Press, 1971; pp 135 - 541.
55. **Franchini M.**, Gilli U., Akens M.K., Fellenberg R.V. y Bracher V. The role of neutrophil chemotactic cytokines in the pathogenesis of equine chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1998; 66: 53 - 65.
56. **Fridén J. y Lieber R.** Segmental muscle fiber lesions after repetitive eccentric contractions. *Cell Tissue Res* 1998; 293: 165 - 171.
57. **Fujii Y.**, Guo Y. y Hussain S.N. Regulation of nitric oxide production in response to skeletal muscle activation. *Journal of Applied Physiology* 1998; 85: 2330 - 2336.

58. **Fujimoto K.**, Kubo K., Yamamoto H., Yamaguchi S. y Matsuzawa Y. Eosinophilic inflammation in the airway is related to glucocorticoid reversibility in patients with pulmonary emphysema. *Chest* 1999; 115: 697 - 702.
59. **Gauthier G.F. y Lowey S.** Distribution of myosin isoenzymes among skeletal muscle fiber types. *J. Cell Biol.* 1979; 81: 10 – 15.
60. **Gayan-Ramirez G. y Decramer M.** The effect of corticotherapy on respiratory muscles. *Revue des Maladies Respiratoires* 1998; 15: 33 - 41.
61. **Gea J.**, Orozco-Levi M. y Aguar M.C. Adaptative changes concerning the types of fibres and isoforms of myosin in the external intercostal muscle of COPD patients. *Eur. Respir. J.* 1996; 23: 160s.
62. **Gea J.** Myosin gene expression in the respiratory muscles. *Eur. Respir. J.* 1997; 10: 2404 - 2410.
63. **Gea J.**, Sauleda J., Orozco-Levi M., Aguar M.C., Barreiro E. y Broquetas J.M. Función diafragmática durante el ejercicio en pacientes con EPOC severa. *Archiv Bronconeumol.* 1999 (a); 35: 280 - 286.
64. **Gea J.**, Pastó M., Carmona MA., Félez M, Palomeque J. y Broquetas J. Oxidative capacity is preserved but glycolitic activity is reduced in the diaphragm of severe COPD patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999 (b); 159: A579.
65. **Gea J.**, Hamid Q., Czaika G., Zhu E., Mohan-Ram V., Goldspink G. and Grassino A. Expression of myosin heavy-chain isoforms in the respiratory muscles following inspiratory resistive breathing. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 2000; 161: 1274 -78.
66. **Gea J.**, Casadevall C., Barreiro E., Palacio J., Orozco-Levi M., y Broquetas J. Sobreexpresión del gen codificador de la isoforma I de la cadena pesada de miosina en el diafragma de pacientes con EPOC. *Arch Broconeumol* 2001; 37: 39.
67. **Goldspink G.** Molecular mechanism involved in the determination of muscle fibre mass and phenotype (Review). *Adv. Exerc Sports Physiol* 1999; 5: 27 – 29.
68. **Gollnick P.D.**, Ianuzzo D.D. y King D.W. Ultrastructural and enzyme changes in muscle with exercise. *Muscle Metabolism During Exercise* 1971; 11: 69 - 85.
69. **Gollnick P.D. y Saltin B.** Significance of skeletal oxidative enzyme enhancement with endurance training. *Clin. Physiol* 1982; 223: 1 – 12.
70. **Gorza L.**, Sartore S., Thornell L.E. y Schiaffino S. Myosin types and fiber types in cardiac muscle. III. Nodal conduction tissue. *Journal of Cell Biology* 1986; 102: 1758 - 1766.
71. **Gosselin L.E.**, Betlach M., Vailas A.C. y Thomas D.P. Training-induced alterations in young and senescent rat diaphragm muscle. *Journal of Applied Physiology* 1992(a); 72: 1506 -1511.
72. **Gosselin L.E.**, Betlach M., Vailas A.C., Greaser M.L. y Thomas D.P. Myosin heavy chain composition in the rat diaphragm: effect of age and exercise training . *Journal of Applied Physiology* 1992(b); 73: 1282 - 1286.

73. **Guttridge D.C.**, Mayo M.W., Madrid L.V., Wang C.Y. y Baldwin A.S. Jr. NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science* 2000; 289: 2363 – 2366.
74. **Grassino A.** Inspiratory muscle training in COPD patients. *European Respiratory Journal* 1989; 7: 581s - 586s.
75. **Greiwe JS.**, Cheng B., Rubin DC., Yarasheski KE. Y Semenkovich CF. Resistance exercise decreases skeletal muscle tumor necrosis factor in frail elderly humans. *The FASEB Journal* 2001; 15: 475 – 482.
76. **Häggmark T.**, Eriksson E. and Jansson E. Muscle fiber type changes in human skeletal muscle after injuries and immobilization. *Orthopedics* 1986; 9: 181 -185.
77. **Hamzaoui A.**, Hamzaoui K., Salah H. y Chabbou A. Lymphocytes apoptosis in patients with acute exacerbation of asma. *Mediators of Inflammation* 1999; 8: 237 - 243.
78. **Hards J.M.**, Reid W.D., Pardy R.L. y Pare P.D. Respiratory muscle fiber morphometry. Correlation with pulmonary function and nutrition. *Chest* 1990; 97: 1037 – 1044.
79. **Hernández-Frutos N.**, Gáldiz JB., Palacio J. Mariñán M. Orozco-Levi M, Gea J y Broquetas JM. Cambios inducidos en la estructura muscular por cargas inspiratorias crónicas de baja intensidad en un modelo animal. VII Symposium sobre Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, Barcelona, Libro de Resúmenes 2000: 106.
80. **Hildebrand I.L.**, Sylvén C., Esbjörnsson M., Hellström K. and Jansson E. Does chronic hypoxaemia induce transformations of fibre types? *Acta Physiol. Scand.* 1991; 141 : 435 - 439.
81. **Hill A.T.**, Bayley D. y Stockley R.A. The interrelationship of sputum inflammatory markers in patients with chronic bronchitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1999; 160: 893 - 898.
82. **Hopkins D.**, Manchester K.L. y Gregory M. Histochemical and biochemical characteristics of the transient hypertrophy of the denervated rat hemidiaphragm. *Experimental Neurology* 1983; 81: 279 - 293.
83. **Hughes R.L.**, Katz H., Sahgal V., Campbell J.A., Hartz R., y Shields T.W. Fiber size and energy metabolites in five separate muscles from patients with chronic obstructive lung diseases. *Respiration International Review of Thoracic Diseases* 1983; 44: 321 - 328.
84. **Jiang T.X.**, Reid W.D. y Road J.D. Delayed diaphragm injury and diaphragm force production. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1998 (a); 157: 736 - 742.
85. **Jiang T.X.**, Reid W.D., Belcastro A. y Road J.D. Load dependence of secondary diaphragm inflammation and injury after acute inspiratory loading. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1998 (b); 157: 230 - 236.
86. **Johnson GD. y Nogueira Araujo GM.** A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. *J. Immunol. Methods* 1981; 43: 349 -350.

87. **Kanazawa H.**, Shoji S., Yoshikawa T., Hirata K. y Yoshikawa J. Increased production of endogenous nitric oxide in patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Clinical and Experimental Allergy* 1998; 28: 1244 - 1250.
88. **Karlsson J.**, Nordesjo L.O., Jorfeldt L. Y Saltin B. Muscle lactate, ATP, and CP levels during exercise after physical training in man. *J. Appl. Physiol.* 1972; 33: 199 - 203.
89. **Komulainen J.**, Takala T.E.S., Kaipers H. y Hesselink M.K.C. The disruption of myofibre structure in rat skeletal muscle after forced lengthening contractions. *Eur. J. Physiol.* 1998; 436: 735 - 741.
90. **Komulainen J.**, Koskinen S.O., Kalliokoski R., Takala T.E. y Vihko V. Gender differences in skeletal muscle fibre damage after eccentrically biased downhill running in rats. *Acta Physiologica Scandinavica* 1999; 165: 57 - 63.
91. **Kretsinger R.H.** Calmodulin and myosin light chain kinase: how helices are bent. *Science* 1992; 258: 50 - 51.
92. **Kuru S.**, Inukai A., Liang Y., Doyu M., Takano A., Sobue G. Tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in muscles of polymyositis and dermatomyositis. *Acta neuropathologica* 2000; 99: 585 - 588.
93. **Lepp W.A. y Martinez P.** Solid-phase enzyme immunoassay for the detection of HMG nonhistone proteins in their native structure. *Journal of Immunoassay* 1989; 10: 449 - 465.
94. **Levine S.**, Kaiser L., Leferovich J. and Tikunov. Cellular adaptations in the diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* 1997; 337: 1799 -1806.
95. **Li Y.P.**, Schwartz R.J., Waddell I.D., Holloway B.R. y ; Reid M.B. Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF- $\kappa$ B activation in response to tumor necrosis factor alpha. *FASEB journal* 1998; 12: 871 - 880.
96. **Li Y.P. y Reid M.B.** NF- $\kappa$ B mediates the protein loss induced by TNF- $\alpha$  in differentiated skeletal muscle myotubes. *American Journal of Physiology* 2000; 279: R1165 - 1170.
97. **Libera L.D.**, Zennaro R. Sandri M. Ambrosio G.B. y Vescovo G. Apoptosis and atrophy in rat slow skeletal muscles in chronic heart failure. *American journal of physiology* 1999; 277: C982 - 986.
98. **Lieber R.L. y Fridén J.** Muscle damage is not a function of muscle force but active muscle strain. *The American Physiological Society* 1993; 520 - 526.
99. **Lieber R.L.**, Thornell L-E. y Fridén J. Muscle cytoskeletal disruption occurs within the first 15 min of cyclic eccentric contraction. *The American Physiological Society* 1996: 278 - 284.
100. **Lieu F.K.**, Powers S.K., Herb R.A., Criswell D., Martin D., Wood C., Stainsby W. y Chen C.L. Exercise and glucocorticoid-induced diaphragmatic myopathy. *Journal of Applied Physiology* 1993; 75: 763 - 771.

101. **Ling P.R.**, Schwartz J.H. y Bistrrian B.R. Mechanisms of host wasting induced by administration of cytokines in rats. *American journal of physiology* 1997; 272: E333 – 339.
102. **López de Silanes M.D.** Fisiología Veterinaria.. Sistema Respiratorio Ed. Interamericana. Mc Graw-Hill. Madrid. 1995: 383 –348
103. **Lynn R. y Morgan D.L.** Decline running produces more sarcomeres in rat vastus intermedius muscle fibers than doesincline running. *Journal of applied physiology* 1994; 77: 1439 – 1444.
104. **Majori M.**, Corradi M., Caminati A., Cacciani G., Bertacco S. y Pesci A. Predominant TH1 cytokine pattern in peripheral blood from subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1999; 103: 458 - 462.
105. **Maltais F.**, LeBlanc P., Simard C., Jobin J., Berube C., Bruneau J., Carrier L. y Belleau R. Skeletal muscle adaptation to endurance training in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1996 (a); 154: 442 - 447.
106. **Maltais F.**, Simard A.A., Simard C., Jobin J., Desgagnes P. y LeBlanc P. Oxidative capacity of the skeletal muscle and lactic acid kinetics during exercise in normal subjects and in patients with COPD. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1996 (b); 153: 288 - 293.
107. **Maltais F.**, Sullivan M.J., LeBlanc P., Duscha B.D., Schachat F.H., Simard C., Blank J.M. y Jobin J. Altered expression of myosin heavy chain in the vastus lateralis muscle in patients with COPD. *European respiratory journal* 1999; 13: 850 – 854.
108. **Mattson J.P. y Poole D.C.** Pulmonary emphysema decrease hamster skeletal muscle oxidative enzyme capacity. *Journal of Applied Physiology* 1998; 85: 210 - 214.
109. **McCool F.D. y Tzelepis G.E.** Inspiratory muscle training in the patient with neuromuscular disease. *Physical therapy* 1995; 75: 1006 – 1014.
110. **McCully K.**, Shellock F.G., Bank W.J. y Posner J.D. The use of nuclear magnetic resonance to evaluate muscle injury. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 1991; 24: 537 - 542.
111. **McKoy G.**, Leger M.E., Bacou F. y Goldspink G. Differential expression of myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in four functionally diverse rabbit skeletal muscles during pre- and postnatal development. *Developmental Dynamics* 1998; 211: 193 - 203.
112. **McKoy G.**, Ashley W., Mander J., Yang SY., Williams N., Russell B. y Goldspink G. Expression of insulin growth factor-1 splice variants and structural genes in rabbit skeletal muscle induced by stretch and stimulation. *Journal of Physiology* 15 1999; 516: 583 - 592.
113. **Meadows K.A.**, Holly J.M. y Stewart C.E. Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis is associated with suppression of insulin-like growth factor binding protein-5 secretion in differentiating murine skeletal myoblasts. *Journal of Cellular Physiology* 2000; 183: 330 - 337.

114. **Megens-de Letter M.A.**, Visser L.H., van Doorn P.A. y Savelkoul H.F. Cytokines in the muscle tissues of idiopathic inflammatory myopathies: implications for immunopathogenesis and therapy. *European Cytokine Network* 1999; 10: 471 - 478.
115. **Mercadier J.J.**, K, Schwartz, S. Schiaffino, C. Wisnewsky, S. Ausoni, M. Heimbürger, R. Marrash, R. Pariente, and M. Aubier. Myosin heavy chain gene expression changes in the diaphragm of patients with chronic lung hyperinflation. *Am. J. Physiol* 1998; 274: L527 - L534.
116. **Mizuno M.** Human respiratory muscles: fibre morphology and capillary supply. *European Respiratory Journal* 1991; 4: 587 - 601.
117. **Nakayama S. y Kretsinger R.H.** Evolution of the EF-hand family of proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 1994 23: 473 - 507.
118. **Nguyen T.**, Shrager J., Kaiser L., Mei L., Daood M., Watchko J., Rubinstein N., and Levine S. Developmental myosin heavy chains in the adult human diaphragm: coexpression patterns and effect of COPD. *J. Appl. Physiol.* 2000; 88 : 1446 -1456.
119. **Norman J.G.**, Fink G.W., Denham W. Yang J. Carter G. Sexton C. Falkner J. Gower W.R. y Franz M.G. Tissue-specific cytokine production during experimental acute pancreatitis. A probable mechanism for distant organ dysfunction. *Digestive Diseases and Sciences* 1997; 42: 1783 - 1788.
120. **Orozco-Levi M.**, Gea J., Aran X., Masdeu G., Aguar M.C. y Broquetas J.M. Acute hypoxemia and respiratory muscles function in COPD patients. *Am Rev. Respir Dis* 1994; 149: A799
121. **Orozco-Levi M.**, Gea J., Monells J., Aran X., Aguar M.C. y Broquetas J.M. Activity of latissimus dorsi muscle during inspiratory threshold loads. *European respiratory journal* 1995; 8: 441 – 445.
122. **Orozco-Levi M.**, Gea J. y Martínez-Campos J.M. Sarcomere disruption and myosin isoform expression in the diaphragm of COPD patients. *Eur. Respir. J.* 1996; 9: 266s - 267s.
123. **Orozco-Levi M.**, Gea J., Lloreta J.L., Felez M., Minguella J., Serrano S. y Broquetas J.M. Subcellular adaptation of the human diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal* 1999; 13: 371 - 378.
124. **Orozco-Levi M.**, Lloreta J., Minguella J., Serrano S., Broquetas JM. y Gea J. Injury of the human diaphragm associated with exertion and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 (en prensa).
125. **Ostrowski K.**, Rohde T., Zacho M. Asp S. Pedersen B.K. Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *Journal of physiology* 1998 (a); 508: 949 – 953.
126. **Ostrowski K.**, Hermann C., Bangash A., Schjerling P., Nielsen JN. y Pedersen B.K. A trauma-like elevation of plasma cytokines in humans in response to treadmill running. *Journal of physiology* 15 1998 (b); 513: 889 – 894.
127. **Pedersen B.K.** Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise and cytokines. *Immunology and Cell Biology* 2000; 78: 532 - 535.

128. **Pedersen B.K. y Toft A.D.** Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *British Journal of Sports Medicine* 2000; 34: 246 - 251.
129. **Peleman R.A., Kips J.C. y Pauwels R.A.** Therapeutic activities of theophylline in chronic obstructive pulmonary disease. *Clinical and Experimental Allergy* 1998; 28: 53 - 56.
130. **Pesci A., Majori M., Cuomo A., Borciani N., Bertacco S., Cacciani G. y Gabrielli M.** Neutrophils infiltrating bronchial epithelium in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Medicine* 1998; 92: 863 - 870.
131. **Pinelli E., van der Kaaij S.Y., Broeren C.P., Ruitenber E.J, y Rutten V.P.** Measurement of dog cytokines by reverse transcription-quantitative competitive polymerase chain reaction. *Immunogenetics* 1999; 49: 696 - 699.
132. **Polla B., Bottinelli R., Sandoli D., Sardi C. Y Reggiani C.** Cortisone-induced changes in myosin heavy chain distribution in respiratory and hindlimb muscles. *Acta Physiologica Scandinavica* 1994; 151: 53 - 61.
133. **Poole D.C., Lieber R.L. y Mathieu-Costello O.** Myosin and actin filament lengths in diaphragms from emphysematous hamsters. *Journal of Applied Physiology* 1994; 76: 1220 - 1225.
134. **Reid M.B., Shoji T., Moody M.R. y Entman M.L.** Reactive oxygen in skeletal muscle. II. Extracellular release of free radicals. *Journal of Applied Physiology* 1992; 73: 1805 - 1809.
135. **Reid W.D. y Samrai B.** Respiratory muscle training for patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Physical therapy* 1995; 75: 996 - 1005.
136. **Reid W.D. y McGowan N.** Respiratory muscle injury in animal models and humans. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1998; 179: 63 - 80.
137. **Road J.D. y Jiang T.X.** Determinants of diaphragmatic injury. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1998 179: 81 - 86.
138. **Russell B., Wenderoth M.P., Goldspink P.H.** Remodeling of myofibrils: subcellular distribution of myosin heavy chain mRNA and protein. *American Journal of Physiology* 1992; 262: R339 - 345.
139. **Rutgers S.R., Koeter G.H., van der Mark T.W. y Postma D.S.** Short-term treatment with budesonide does not improve hyperresponsiveness to adenosine 5'-monophosphate in COPD. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1998; 157: 880 - 886.
140. **Sanchez J., Derenne J.P., Debesse B., Riquet M. y Monod H.** Typology of the respiratory muscles in normal men and in patients with moderate chronic obstructive disease. *Bull. Eur. Physiopath. Resp.* 1982; 18: 901 - 914.
141. **Sant`Ana Pereira, J.A., Wessels A., Nijtmans L., Moorman A.F. y Sargeant A.J.** New method for the accurate characterization of single human skeletal muscle fibres demonstrates a relation between mATPase and MyHC expression in pure and hybrid fibre types. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 1995 16: 21 - 34.

142. **Saltin B. y Gollnick P.D.** Skeletal muscle adaptability: Significance for metabolism and performance. In: Handbook of Physiology. Skeletal Muscle. Bethesda, M.D.: Am. Physiol. Soc. 1983; sec 10, capítulo 19: pp 555 - 631.
143. **Satta A.**, Migliori G.B., Spanevello A., Neri M., Bottinelli R., Canepari M., Pellegrino M.A. y Reggiani C. Fibre types in skeletal muscles of chronic obstructive pulmonary disease patients related to respiratory function and exercise tolerance. *European Respiratory Journal* 1997; 10: 2853 - 2860.
144. **Sauleda J.**, Gea J., Orozco-Levi M., Corominas J., Minguella J., Aguar C., Broquetas J. y Agustí A.G. Structure and function relationships of the respiratory muscles. *European Respiratory Journal* 1998; 11: 906 - 911.
145. **Schiaffino S.**, Saggin L., Viel A., Ausoni S., Sartore S. y Gorza L. Muscle fiber types identified by monoclonal antibodies to myosin heavy chains. In: *Biochemical aspects of Physical Exercise*, ed. By G.Benzi, L. Packer, N. Siliprandi. Amsterdam: Elsevier 1986; pp 27 - 34.
146. **Schiaffino S.**, Gorza L, Ausoni S., Botinelli R., Reggiani C., Larsson L., Edstrom L., Gundersen K. y Lomo T. Muscle fiber types expressing different myosin heavy chain isoforms: Their functional properties and adaptative capacity. In: D. Pette. *The Dynamic State of Muscle Fibers*, Berlin, De Gruyter 1990; pp 329 - 341.
147. **Schiaffino S. y Reggiani C.** Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J. Appl Physiol* 1994; 77: 493 - 501.
148. **Schiaffino S. y Reggiani C.** Molecular diversity of myofibrillar proteins: Gene regulation and Functional Significance. *Physiological Reviews* 1996; 76: 371 - 423.
149. **Secher N.H.**, Mizuno M. y Saltin B. Adaptation of skeletal muscles to training. *Bulletin European Physiopathologie Respiratoire* 1984; 20: 453 - 457.
150. **Sheehan D.Z.** and Hrapchak B.B. *Theory and practice of histotechnology*. 1980; Ed. The C.V.Mosby Company. San Luis, EEUU: pp142 – 144.
151. **Silvestre J.S.**, Tallat Z., Duriez M., Tamarat R., Bureau M.F., Scherman D., Duverger N., Branellec D., Tedgui A. y Levy B.I. Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circulation research* 2000; 87: 448 – 452.
152. **Simpson A.H.**, Williams P.E., Kyberd P., Goldspink G. y Kenwright J. The response of muscle to leg lengthening. *Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume* 1995; 77: 630 – 636.
153. **Silver M.M. y Smith C.R.** Diaphragmatic contraction band necrosis in a perinatal and infantile autopsy population. *Human Pathology* 1992; 23: 817 - 827.
154. **Smerdu V.**, Karsch-Mizrachi I., Campione M., Leinwand L. y Schiaffino S. Type IIx myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle. *American Journal of Physiology* 1994; 267: C1723 - 1728.
155. **Smith L.L.**, Anwar A., Fragen M., Rananto C., Johnson R. y Holbert D. Cytokines and cell adhesion molecules associated with high-intensity eccentric exercise. *Eur J Appl Physiol* 2000; 82: 61 - 67.

156. **Staron R.S. y Johnson P.** Myosin polymorphismo and differential expresiion in adult human skeletal muscle. *Comp. Biochem Physiol* 1993; 106B: 463 - 475.
157. **Staron R.S.** Human skeletal muscle fiber types: delineation, development, and distribution. *Canadian Journal of Applied Physiology* 1997 22: 307 - 27.
158. **Steele R.H. Heard B.E.** Size of the diaphragm in chronic bronchitis. *Thorax* 1973; 28: 55 - 60.
159. **St. Pierre B.A. y Tidball J.G.** Macrophage activation and muscle remodeling at myotendinous junctions after modifications in muscle loading. *American journal of pathology* 1994; 145: 1463 – 1471.
160. **Sugiura T., Morimoto A., y Murakami N.** Effects of endurance training on myosin heavy-chain isoforms and enzyme activity in the rat diaphragm. *Pflugers Archiv* 1992; 421: 77 - 81.
161. **Supinski G.S. y Kelsen S.G.** Effect of elastase-induced emphysema on the force generating ability of the diaphragm. *J. Clin. Invest.* 1982; 70: 978 - 988.
162. **Suzuki K., Yamada M., Kurakake S., Okamura N., Yamaya K., Liu Q. Kudoh S., Kowatari K., Nakaji S. y Sugawara K.** Circulating cytokines and hormones with immunosuppressive but neutrophil-priming potentials rise after endurance exercise in humans. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology* 2000; 8: 281 - 287.
163. **Takabatake N., Nakamura H., Abe S., Hino T., Saito H., Yuki H., Kato S. y Tomoike H.** Circulating leptin in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1999; 159: 1215 – 1219.
164. **Takabatake N., Nakamura H., Inoue S., Terashita K., Yuki H., Kato S., Yasumura S. y Tomoike H.** Circulating levels of soluble Fas ligand and soluble Fas in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory medicine* 2000 (a); 94: 1215 - 1220.
165. **Takabatake N., Nakamura H., Abe S., Inoue S., Hino T., Saito H., Yuki H., Kato S. y Tomoike H.** The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor-alpha system in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2000 (b); 161: 1179 - 1184.
166. **Talmadge R.J. y Roy R.R.** Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *Journal of Applied Physiology* 1993; 75: 2337 - 2340.
167. **Tabary J.C., Tabary C., Tardieu C., Tardieu G. Y Goldspink G.** Physiological and structural changes in the cat's soleus muscle due to immobilization at different lengths by plaster casts. *Journal of Physiology* 1972; 224: 231 - 244.
168. **Taneda A., Shindoh C., Ohuchi Y. y Shirato K.** Protective effects of interleukin-10 on diaphragm muscle in a septic animal model. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 1998; 185: 45 - 54.
169. **Tidball J.G., Albrecht D.E., Lokensgard B.E. y Spencer M.J.** Apoptosis precedes necrosis of dystrophin-deficient muscle. *Journal of cell science* 1995 (a); 108: 2197 – 2204.

170. **Tidball J.G.** Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Medicine and science in sports and exercise* 1995 (b); 27: 1022 – 1032.
171. **Tidball J.G. y St. Pierre B.A.** Apoptosis of macrophages during the resolution of muscle inflammation. *Journal of leukocyte biology* 1996; 59: 380 – 388.
172. **Trump B.F.**, Berezesky I.K., Laiho K.U., Osorino A.R., Mergner W.J. y Smith M.W. The role of calcium in cell injury. *Scanning Electron Microscopy*. Chicago: AMF O'Hare, 1980; 437 - 462.
173. **Thomason D.B. y Booth F.W.** Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J. Appl. Physiol* 1990; 68 : 1 -12.
174. **Thurlbeck W.M.** Diaphragm and body weight in emphysema. *Thorax* 1978; 33: 483 - 487.
175. **Tolep K. y Kelsen S.G.** Effect of aging on respiratory skeletal muscle. *Clinics in Chest Medicine* 1993; 14: 363 - 378.
176. **Towbin J.**, Stachelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: produces and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350 – 4354.
177. **Vartio T.**, Laitinen L., Närvänen O., Cutolo M., Thornell L-E. y Virtanen I. Differential expression of the ED sequence-containing form of cellular fibronectin in embryonic and adult human tissues. *J. Cell Sci* 1987; 88:419 - 430.
178. **Veldhuizen J.W.**, Verstappen F.T.J., Vroemen J., Kuipers H. and Greep J.M. Functional and morphological adaptations following four weeks of knee immobilization. *Int. J. Sports Med.* 1993; 14 : 283 -287.
179. **Wakabayashi K.**, Tokunaga M., Kohno I., Sugimoto Y., Hamanaka T., Takezawa Y., Wakabayashi T., y Amemiya Y. Small-angle synchrotron x-ray scattering reveals distinct shape changes of the myosin head during hydrolysis of ATP. *Science* 1992; 258: 443 – 447.
180. **West-Jordan J.A.**, Martin P.A., Abraham R.J., Edwards R.H. y Jackson M.J. Energy metabolism during damaging contractile activity in isolated skeletal muscle: a <sup>31</sup>P-NMR study. *Clin. Chim. Act.* 1991; 203: 119 – 134.
181. **Williams P.**, Kyberd P., Simpson H., Kenwright J. y Goldspink G. The morphological basis of increased stiffness of rabbit tibialis anterior muscles during surgical limb-lengthening. *Journal of Anatomy* 1998; 193: 131 - 138.
182. **Williams P.**, Simpson H., Kyberd P., Kenwright J. Y Goldspink G. Effect of rate of distraction on loss of range of joint movement, muscle stiffness, and intramuscular connective tissue content during surgical limb-lengthening: a study in the rabbit. *Anatomical Record* 1999; 255: 78 - 83.
183. **Weiss A.**, Schiaffino S. y Leinwand L.A. Comparative sequence analysis of the complete human sarcomeric myosin heavy chain family: implications for functional diversity. *Journal of Molecular Biology* 1999 290: 61 - 75.

184. **Whitton F.**, Jobin J., Simard P-R., Leblanc P., Simard C., Bernard S., Belleau R. and Maltais F. Histochemical and morphological characteristics of the vastus lateralis muscle in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1998; 30: 1467 -1474 .
185. **Yamamoto C.**, Yoneda T., Yoshikawa M., Fu A., Tokuyama T., Tsukaguchi K. y Narita N. Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest* 1997; 112: 505 - 510.
186. **Yang S.**, Alnaqeeb M., Simpson H., Goldspink G. Cloning and characterization of an IGF-1 isoform expressed in skeletal muscle subjected to stretch. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 1996; 17: 487 - 495.
187. **Yang H.**, Alnaqeeb M., Simpson H., Goldspink G. Changes in muscle fibre type, muscle mass and IGF-I gene expression in rabbit skeletal muscle subjected to stretch. *Journal of Anatomy* 1997; 190: 613 - 622.
188. **Yasuda N.**, Gotoh K., Minatoguchi S., Asano K., Nishigaki K., Nomura M., Ohno A., Watanabe M., Sano H., Kumada H., Sawa T. y Fujiwara H. An increase of soluble Fas, an inhibitor of apoptosis, associated with progression of COPD. *Respiratory medicine* 1998; 92: 993 – 999.
189. **Zhan W.Z. y Sieck G.C.** Adaptations of diaphragm and medial gastrocnemius muscles to inactivity. *Journal of Applied Physiology* 1992; 72: 1445 - 1453.
190. **Zhang Y.**, Pilon G., Marette A. y Baracos V.E. Cytokines and endotoxin induce cytokine receptors in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279: E196 - 205.
191. **Zhu E.**, Petrof B.J., Gea J., Comtois N. y Grassino A.E. Diaphragm muscle fiber injury after inspiratory resistive breathing. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1997; 155: 1110 - 1116.
192. **Zissel G.**, Ernst M., Schlaak M. y Muller-Quernheim J. Accessory function of alveolar macrophages from patients with sarcoidosis and other granulomatous and nongranulomatous lung diseases. *Journal of Investigative Medicine* 1997; 45: 75 - 86.
193. **Zucker K.**, Lu P., Fuller L., Asthana D., Esquenazi V. y Miller J. Cloning and expression of the cDNA for canine tumor necrosis factor-alpha in E. coli. *Lymphokine and Cytokine Research* 1994; 13: 191 - 196.
194. **Zuo L.**, Christofi F.L., Wright V.P., Liu C.Y., Merola A.J., Berliner L.J. y Clanton T.L. Intra- and extracellular measurement of reactive oxygen species produced during heat stress in diaphragm muscle. *American Journal of Physiology* 2000; 249: C1058 - 1066.