

Universitat Autònoma de Barcelona

DEPARTAMENT DE MEDICINA

Facultat de Medicina

**Alteracions respiratòries durant el son: Inflamació
i canvis fenotípics al múscul intercostal extern.**

Tesi Doctoral presentada per Josep Oriol Pallàs i Villaronga
per a optar al grau de Doctor en Medicina.

Director: Dr. Joaquim Gea Guiral

Co-director: Dr. Joaquim Coll Daroca

Barcelona 2012

Dedicatòria:

A la Sílvia, que m'ha ensenyat el que és estimar i el que és compartir tot en la vida.

A l'Eduard, la Sílvia i la Mireia, que m'han mostrat la bellesa de la innocència i l'alegria de donar-se.

Als meus pares, que em van ensenyar a tenir fe i confiança, i que des del cel encara guien el meu camí.

Als meus germans grans, l'Albert, en Jordi i en Joaquim, que em van inculcar un esperit crític.

Als meus germans petits, la Maria Rosa i l'Ignasi, dels que vaig aprendre el que és sentir-se responsable.

Agraïments:

Al Dr. Gea, per la seva paciència i capacitat docent i per saber treure de cadascú el millor que té.

Al Dr. Coll, perquè sense el seu ajut aquesta tesi no s'hauria acabat.

Al Dr. Arán (en "Xavi"), que anava a ser el meu Director de Tesi...

A la Dra. Barreiro, la Dra. Casadevall i a tots els membres del Laboratori de La Unitat de Recerca en Múscul i Aparell Respiratori de l'I.M.I.M.

Als Drs. Nowinski i Sliwinski de l'Institut de Tuberculosi i Malalties Pulmonars de Varsòvia (Polònia).

Als meus companys i amics del Servei d'Urgències de l'Hospital del Mar, pel seu suport.

A tots els metges, als clínics que cada dia fan possible que l'atenció als pacients sigui una realitat malgrat les dificultats.

A tots els investigadors i becaris, que fan possible l'avenç científic malgrat totes les limitacions que pateixen.

Als pacients, per la seva col.laboració i comprensió.

A tants i tants que, de manera anònima, han ajudat a que aquest treball vegi la llum.

Els resultats de la present tesi doctoral han estat presentats parcialment a

- American Thoracic Society (ATS) 2008 International Conference:

O. Pallàs, A. Nowinski, C. Casadevall, E. Barreiro, P. Sliwinski, J. Gea (on behalf of the ERESMUS in COPD group). Differential inflammatory activity observed in respiratory muscles of patients with COPD, Obstructive Sleep Apnea Syndrome and Overlap Syndrome. Toronto (ON, CAN). *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177 (abstracts issue): A27.

- XLI Congreso Nacional de la SEPAR (2008):

O. Pallàs, A. Nowinski, C. Casadevall, E. Barreiro, M. Orozco-Levi, P. Sliwinski, J. Gea. Actividad inflamatoria celular y molecular en los músculos intercostales de pacientes con EPOC, Síndrome de Apneas del Sueño (SAHS) y Síndrome de Composición (OS). Tenerife. *Arch Bronconeumol* 2008; 44 (extraordinario 1): 187.

Finançament:

- European Commission. Ref. BMTH4-CT98-3406 ("European Network for the study of Clinical and Biological implications of RESpiratory MUScles Failure in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease", "ERESMUS in COPD").

- European Commission. Ref. QLRT-2001-02285 (European Network for Investigating the Global mechanisms of Muscle Abnormalities in COPD, "ENIGMA in COPD").

- CIBER de Investigación en Enfermedades Respiratorias (ISC III). Ref. CB06/06/0043,

- Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica. Ref. SAF2001-0426. "Cronología del remodelamiento de los músculos esqueléticos (respiratorios y periféricos) en pacientes con EPOC: Implicaciones del estrés oxidativo".

- Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica. Ref. SAF2007-62719. "Efectos de la hipoxemia y las cargas respiratorias sobre los músculos ventilatorios: papel del TNF-alfa y del estrés oxidativo".

- Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació (DURSI), Generalitat de Catalunya. Grup de Recerca Consolidat. Ref. 2005SGR01060 i ref. 2009SGR393.

Índex d'abreviatures.

AHI: Índex d'Apnees i Hipopnees
BMI: Índex de Massa Corporal
CPAP: Pressió Positiva Contínua a la via Aèria
DLCO: Capacitat de Transferència del Monòxid de Carboni (CO)
DLCO/VA: Relació entre la DLCO i el volum alveolar
eNOS: Isoforma endotelial de la Sintetasa de l'Òxid Nítric
ESS: Escala de Somnolència d'Epworth
FEV₁: Volum Espiratori Forçat en el primer segon
FRC: Capacitat Residual Funcional
FVC: Capacitat Vital Forçada
HD: Hiperinsuflació dinàmica
HO-1: Hemoxigenasa 1
IL-1: Interleucina 1
IL-6: Interleucina 6
IL-10: Interleucina 10
iNOS: Isoforma induïble de la Sintetasa de l'Òxid Nítric
MMRR: Músculs respiratoris
MPOC: Malaltia Pulmonar Obstructiva Crònica
MyHC-I: Cadenes Pesants de Miosina de tipus I
MyHC-IIa: Cadenes Pesants de Miosina de tipus IIa
MyHC-IIx: Cadenes Pesants de Miosina de tipus IIx
nNOS: Isoforma neuronal de la Sintetasa de l'Òxid Nítric
OS: *Overlap Syndrome* respiratori (Síndrome de Composició)

Index d'abreviatures (cont.).

PaCO₂: Pressió parcial de diòxid de carboni arterial

PaO₂: Pressió parcial d'oxigen arterial

PEM: Pressió Espiratòria Màxima

PIM: Pressió Inspiratòria Màxima

RT-PCR: Reacció en Cadena de la Polimerasa amb Transcripció Reversa

RV: Volum Residual

SAHS: Síndrome d'Apnees i Hipopnees del Son

SaO₂: Saturació arterial d'oxihemoglobina

T90: Temps per sota d'una saturació d'oxigen del 90%

TLC: Capacitat Pulmonar Total

TNF: Factor de Necrosi Tumoral *alfa*

TNFr1: Receptor 1 del Factor de Necrosi Tumoral *alfa*

TNFr2: Receptor 2 del Factor de Necrosi Tumoral *alfa*

VAS: Via aèria superior

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ.

<u>Comentari preliminar.</u>	3
<u>I. EL MÚSCUL ESQUELÈTIC. ESTRUCTURA CEL.LULAR i MOLECULAR.</u>	7
<u>I.1. INTRODUCCIÓ.</u>	7
<u>I.1.1. Hi ha tres tipus de múscul.</u>	7
<u>I.2. ESTRUCTURA CEL.LULAR DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC.</u>	8
<u>I.2.1. La miosina.</u>	9
<u>I.2.1.1. Tipus de miosina.</u>	12
<u>I.2.1.2. La miosina condiona el tipus de fibra muscular.</u>	13
<u>I.2.1.3. Miosina y expressió gènica.</u>	17
<u>I.2.1.3.a. Factors que regulen l'expressió gènica de les MyHC.</u>	17
<u>I.2.1.3.b. Expressió gènica de les MyHC i músculs respiratoris.</u>	20
<u>I.2.2. L'actina.</u>	22
<u>I.2.2.1. Actina i fibra muscular.</u>	23
<u>I.2.3. Altres proteïnes presents en el múscul esquelètic.</u>	24
<u>I.3. EL PROCÉS DE LA CONTRACCIÓ MUSCULAR.</u>	27
<u>I.3.1. Contracció muscular. Fonts d'energia.</u>	28
<u>I.3.2. Detalls de la contracció muscular.</u>	29
<u>II. ELS MÚSCULS RESPIRATORIS.</u>	31
<u>Els músculs respiratoris del cos humà són músculs estriats.</u>	31
<u>II.1. ESTUDI DELS MÚSCULS RESPIRATORIS.</u>	31
<u>II.1.1. Els músculs inspiratoris.</u>	31
<u>II.1.2. Els músculs espiratoris.</u>	32
<u>II.2. ANATOMIA DELS MÚSCULS INTERCOSTALS.</u>	33
<u>II.3. FUNCIÓ DELS MÚSCULS INTERCOSTALS.</u>	38
<u>II.3.1. Biomecànica de la caixa toràcica. Els ossos.</u>	38
<u>II.3.2. La respiració. Els músculs.</u>	39
<u>II.3.2.1. Els músculs respiratoris durant la inspiració.</u>	39
<u>II.3.2.2. Els músculs respiratoris durant l'expiració.</u>	41
<u>II.3.2.3. La musculatura de la faringe intervé en la mecànica ventilatòria.</u>	42
<u>II.3.3. Quina és la funció primordial dels músculs intercostals?</u>	42
<u>II.3.3.1. Antecedents històrics.</u>	42
<u>II.3.3.2. Estudis contemporanis en humans.</u>	43
<u>II.3.3.3. Avantatge mecànic.</u>	44
<u>II.3.3.4. Massa dels M. intercostals.</u>	45
<u>II.3.3.5. Sumari sobre les accions dels M. intercostals.</u>	46

II.4. <u>ESTUDI CEL·LULAR DELS MÚSCULS INTERCOSTALS.</u>	47
II.4.1. <u>Tipus de fibres en els músculs respiratoris.</u>	47
II.4.1.1. Tipus de fibres en el M. diafragma (mecanismes d'adaptació cel·lular que expliquen dades fisiològiques).	47
II.4.1.2. Morfometria dels M. intercostals externs.	48
III. <u>INFLAMACIÓ.</u>	56
III.1. <u>INTRODUCCIÓ.</u>	56
III.1.1. <u>Concepte.</u>	56
III.1.2. <u>Tipus d'inflamació.</u>	57
III.2. <u>RESPOSTA CEL·LULAR A LA INFLAMACIÓ.</u>	58
III.2.1. <u>Origen de les cèl·lules sanguínies.</u>	59
III.2.2. <u>Neutròfils.</u>	59
III.2.3. <u>Limfòcits.</u>	60
III.2.3.1. Limfòcits T.	62
III.2.3.2. Limfòcits B.	65
III.2.4. <u>Cèl·lules NK.</u>	66
III.2.5. <u>Monòcits i macròfags.</u>	66
III.2.5.1. Funcions dels monòcits/macròfags.	67
III.2.6. <u>Cèl·lules dendrítiques.</u>	69
III.3. <u>MEDIADORS QUÍMICS DE LA INFLAMACIÓ.</u>	70
III.3.1. <u>Citocines.</u>	72
III.3.2. <u>Quimiocines.</u>	74
III.3.3. <u>Factor nuclear kappa B.</u>	75
III.3.4. <u>Òxid nítric.</u>	77
III.3.4.1. Òxid nítric i inflamació.	78
III.3.4.2. Òxid nítric i múscul esquelètic.	79
IV. <u>LA SÍNDROME D'APNEES i HIPOPNEES DEL SON (SAHS).</u>	80
IV.1. <u>CONCEPTES.</u>	81
IV.2. <u>ETIOPATOGÈNIA DE LA SAHS.</u>	82
IV.2.1. <u>Visió de conjunt. Esdeveniments considerats globalment.</u>	82
IV.2.2. <u>Alteracions anatòmiques associades a la SAHS.</u>	83
IV.2.3. <u>Trastorns funcionals associats a la SAHS.</u>	85
IV.2.4. <u>Fisiopatologia de les complicacions cardiovasculars.</u>	86
IV.3. <u>MANIFESTACIONS CLÍNiques.</u>	86
IV.3.1. <u>Conseqüències clíniques de la SAHS.</u>	89
IV.4. <u>DIAGNÒSTIC DE LA SAHS.</u>	90

IV.5. <u>TRACTAMENT DE LA SAHS.</u>	90
IV.5.1. <u>Mesures generals.</u>	90
IV.5.2. <u>CPAP.</u>	91
IV.5.3. <u>Cirurgia.</u>	92
IV.5.4. <u>Altres tractaments.</u>	93
IV.6. <u>SAHS I MÚSCUL.</u>	94
IV.6.1. <u>Els músculs estriats durant el son.</u>	94
IV.6.2. <u>Els músculs estriats a la SAHS.</u>	95
IV.7. <u>SAHS I INFLAMACIÓ.</u>	98
IV.7.1. <u>Resposta inflamatòria a nivell de la via aèria superior en malalts amb SAHS.</u> ..	98
IV.7.2. <u>Resposta inflamatòria sistèmica a la SAHS.</u>	99
IV.7.2.1. <u>La PCR a la SAHS.</u>	99
IV.7.2.2. <u>Les citocines a la SAHS.</u>	100
IV.7.2.3. <u>Les molècules d'adhesió cel.lular a la SAHS.</u>	101
IV.7.2.4. <u>Les cèl.lules inflamatòries a la SAHS.</u>	101
IV.7.3. <u>Possibles mecanismes implicats en el procés inflamatori a la SAHS.</u>	102
V. <u>LA MALATIA PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÒNICA (MPOC).</u>	104
V.1. <u>ASPECTES CLÍNICS DE LA MPOC.</u>	104
V.1.1. <u>Concepte de MPOC.</u>	104
V.1.2. <u>Aproximació diagnòstica i maneig de la MPOC.</u>	105
V.1.2.1. <u>Avaluació del malalt amb MPOC.</u>	105
V.1.2.2. <u>Principals novetats en el maneig de la MPOC.</u>	108
V.2. <u>RELACIÓ ENTRE INFLAMACIÓ I FUNCIÓ MUSCULAR A LA MPOC.</u>	112
V.2.1. <u>Inflamació i múscul.</u>	112
V.2.1.1. <u>La cèl.lula muscular té capacitat immune.</u>	112
V.2.1.2. <u>La cèl.lula muscular pot actuar com a cèl.lula presentadora d'antígens.</u>	113
V.2.1.3. <u>Fibra muscular i molècules del MHC de classe II.</u>	114
V.2.1.4. <u>Fibra muscular i molècules del MHC de classe I.</u>	114
V.2.1.5. <u>Fibra muscular i molècules d'adhesió.</u>	115
V.2.1.6. <u>Citocines i quimiocines a les cèl.lules musculars esquelètiques.</u>	116
V.2.1.6.a. <u>Les citocines poden tenir efectes ambivalents en el teixit muscular.</u>	117
V.2.2. <u>Inflamació sistèmica i disfunció muscular a la MPOC.</u>	119
V.2.2.1. <u>Disfunció muscular (perifèrica) a la MPOC.</u>	119
V.2.2.2. <u>Inflamació sistèmica a la MPOC.</u>	120
V.2.2.3. <u>Resposta cel.lular inflamatòria i múscul.</u>	122
V.2.2.4. <u>Cèl.lules inflamatòries i múscul a la MPOC.</u>	123

VI. <u>L'OVERLAP SYNDROME.</u>	126
VI.1. <u>LA MPOC I EL SON.</u>	126
VI.1.1. <u>Mecanismes responsables de les dessaturacions nocturnes en els malalts amb MPOC.</u>	127
VI.1.2. <u>Conseqüències de la hipoxèmia associada al son.</u>	129
VI.1.3. <u>Trastorns del son en els pacients amb MPOC.</u>	129
VI.2. <u>L'OVERLAP SYNDROME (COEXISTÈNCIA DE MPOC i SAHS).</u>	131
VI.2.1. <u>Qualitat del son.</u>	131
VI.2.2. <u>Saturació d'oxihemoglobina durant la nit.</u>	132
VI.2.3. <u>Funció pulmonar i gasos arterials durant el dia.</u>	132
VI.2.4. <u>Hipertensió arterial pulmonar.</u>	133
VI.2.5. <u>Diagnòstic i tractament dels pacients amb OS.</u>	134
VII. <u>L'OBESITAT.</u>	136
VII.1. <u>GENERALITATS.</u>	136
VII.1.1. <u>Definició d'obesitat.</u>	137
VII.1.2. <u>Epidemiologia de l'obesitat.</u>	138
VII.1.3. <u>Malalties associades (morbi-mortalitat).</u>	139
VII.2. <u>ALTERACIONS RESPIRATÒRIES ASSOCIADES A L'OBESITAT.</u>	141
VII.2.1. <u>Volums pulmonars.</u>	142
VII.2.2. <u>Efectes de la pèrdua ponderal.</u>	143
VII.3. <u>OBESITAT I SAHS.</u>	144
VII.4. <u>LA SÍNDROME D'HIPOVENTILACIÓ-OBESITAT.</u>	146
VII.5. <u>OBESITAT I HIPERREACTIVITAT BRONQUIAL / ASMA.</u>	149
VII.6. <u>OBESITAT I MÚSCUL.</u>	151
VII.7. <u>OBESITAT I INFLAMACIÓ.</u>	153
VII.7.1. <u>Teixit adipós i inflamació.</u>	153
VII.7.2. <u>Adipocines i inflamació.</u>	154
VII.7.2.1. <u>Leptina.</u>	154
VII.7.2.2. <u>Adiponectina.</u>	155
VII.7.2.3. <u>Resistina.</u>	155
<u>HIPÒTESI.</u>	
VIII. <u>HIPÒTESI.</u>	159

OBJECTIUS.

IX. OBJECTIUS. 165

MATERIAL I MÈTODE.

X. MATERIAL I MÈTODE. 169

X.1. DISSENY DE L'ESTUDI. 169

X.2. POBLACIÓ D'ESTUDI. 170

X.3. CRITERIS D'INCLUSIÓ. 170

X.4. CRITERIS D'EXCLUSIÓ. 171

X.5. AVALUACIÓ CLÍNICA, NUTRICIONAL I FUNCIONAL DELS PACIENTS. 173

X.6. ESTUDI DEL SON. 174

X.7. TÈCNICA PER A OBTENIR LES MOSTRES MUSCULARS. 176

X.7.1. Processament de les mostres musculars. 176

X.8. TÈCNiques IMMUNOHISTOQUÍMIQUES. 177

X.8.1. Estudi de la morfometria. 177

X.8.2. Estudi del component cel.lular de la inflamació. 180

X.8.2.1. Identificació i quantificació de les cèl.lules inflamatòries. 181

X.8.2.1.a. Leucòcits (cèl.lules CD45+). 181

X.8.2.1.b. Macròfags (cèl.lules CD68+). 182

X.8.2.2. Criteris utilitzats per a considerar que una cèl.lula inflamatòria es trobava estrictament en el teixit muscular. 185

X.9. TÈCNICA DE LA REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TEMPS REAL (RT-PCR). 186

X.9.1. Tècnica de la RT-PCR. 186

X.9.1.1. Aïllament i purificació de l'ARN. 186

X.9.1.2. Transcripció Reversa. 187

X.9.1.3. PCR a temps real. 187

X.10. ANÀLISI ESTADÍSTICA. 191

RESULTATS.

XI. RESULTATS. PART 1. 195

XI.1. DESCRIPCIÓ GLOBAL DE LA POBLACIÓ ESTUDIADA. 195

XI.1.1. Característiques demogràfiques i antropomètriques. 195

XI.1.2. Funció pulmonar. 195

XI.1.3. Funció muscular. 195

XI.1.4. Estudi del son. 195

XI.2. MORFOMETRIA MUSCULAR I EXPRESSIÓ DE LES ISOFORMES DE MyHC.	202
XI.2.1. Morfometria.	202
XI.2.1.1. Consideracions generals.	202
XI.2.1.2. Percentatges fibril.lars.	203
XI.2.1.3. Tamany global de les fibres.	206
XI.2.1.4. Tamany de les fibres tipus I (àrea).	208
XI.2.1.5. Tamany de les fibres tipus II (àrea).	209
XI.2.1.6. Espai ocupat per les fibres tipus I.	212
XI.2.1.7. Espai ocupat per les fibres tipus II.	215
XI.2.2. Expressió gènica de les cadenes pesants de miosina.	218
XI.2.2.1. Expressió del gen de la MyHC I.	218
XI.2.2.2. Expressió del gen de la MyHC IIa.	221
XI.2.2.3. Expressió del gen de la MyHC IIx.	223
XI.3. RESULTATS INFLAMACIÓ.	226
XI.3.1. Consideracions generals.	226
XI.3.2. Identificació de cèl.lules inflamatòries.	226
XI.3.2.1. Presència de leucòcits (cèl.lules CD45+).	227
XI.3.2.2. Presència de macròfags (cèl.lules CD68+).	229
XI.3.3. Expressió gènica de citocines i dels receptors de citocines.	232
XI.3.3.1. Interleucina – 1.	232
XI.3.3.2. Interleucina – 6.	234
XI.3.3.3. Factor de necrosi tumoral <i>alfa</i> (TNF).	237
XI.3.3.4. Receptor 1 del TNF.	239
XI.3.3.5. Receptor 2 del TNF.	242
XI.3.3.6. Interleucina – 10.	244
XI.4. RESUM DE RESULTATS. PART 1.	247
XI.5. ADDENDUM DE RESULTATS. PART 1.	252
XI.5.1. Estrès oxidatiu i Òxid Nítric.	252
XI.5.1.1. Hemoxigenasa - 1 (HO-1).	252
XI.5.1.2. Òxid nítric sintetasa induïble (iNOS).	255
XI.5.1.3. Òxid nítric sintetasa endotelial (eNOS).	255
XI.5.1.4. Òxid nítric sintetasa neuronal (nNOS).	256
XI.5.2. Gens lligats al metabolisme (leptina).	258
XI.5.3. Resum de l'Addendum de Resultats.	260

XII. <u>RESULTATS. PART 2.</u>	261
XII.1. <u>EFFECTES DEL TRACTAMENT AMB CPAP.</u>	261
XII.1.1. <u>Estudi de la funció respiratòria diürna.</u>	262
XII.1.2. <u>Estudi de la funció muscular i de la tolerància a l'exercici.</u>	262
XII.1.3. <u>Estudi del son.</u>	266
XII.1.4. <u>Morfometria muscular.</u>	268
XII.1.5. <u>Estudi de l'expressió gènica de les cadenes pesants de miosina.</u>	270
XII.1.6. <u>Estudi de l'expressió gènica de les citocines i dels seus receptors.</u>	270
XII.2. <u>RESUM DE RESULTATS. PART 2. EFECTE DEL TRACTAMENT AMB CPAP.</u>	273
XII.3. <u>ADDENDUM DE RESULTATS. PART 2.</u>	275
XIII. <u>RESULTATS. PART 3.</u>	277
XIII.1. <u>CORRELACIONS.</u>	277
XIII.1.1. <u>Grup Obesitat.</u>	278
XIII.1.2. <u>Grup MPOC.</u>	282
XIII.1.3. <u>Grup SAHS.</u>	285
XIII.1.3.1. <u>Correlacions basals.</u>	285
XIII.1.3.2. <u>Correlacions. Efecte del tractament amb CPAP.</u>	287
XIII.1.4. <u>Grup Overlap.</u>	295
XIII.1.4.1. <u>Correlacions basals.</u>	295
XIII.1.4.2. <u>Correlacions. Efecte del tractament amb CPAP.</u>	297
<u>DISCUSSIÓ.</u>	
XIV. <u>DISCUSSIÓ.</u>	305
XIV.1. <u>MORFOMETRIA MUSCULAR.</u>	306
XIV.1.1. <u>Percentatges fibril.lars.</u>	306
XIV.1.2. <u>Tamany de les fibres.</u>	310
XIV.1.3. <u>Espai ocupat per les fibres.</u>	310
XIV.2. <u>EXPRESSIÓ DELS GENS DE LES CADENES PESANTS DE MIOSINA (MyHC).</u>	311
XIV.3. <u>INFLAMACIÓ.</u>	312
XIV.3.1. <u>Inflamació cel.lular en el múscul a la MPOC.</u>	315
XIV.3.2. <u>Inflamació cel.lular a la SAHS.</u>	318
XIV.3.3. <u>Inflamació cel.lular a l'OS.</u>	321
XIV.3.4. <u>Citocines. Inflamació i antiinflamació a nivell molecular.</u>	322
XIV.3.4.1. <u>Comentaris de discussió sobre les citocines. Interpretació dels resultats a la llum d'altres estudis.</u>	323

XIV.4. DISCUSSIÓ SOBRE ELS EFECTES DEL TRACTAMENT AMB CPAP.	329
XIV.4.1. Efectes de la CPAP sobre la funció respiratòria diürna.	329
XIV.4.2. Efectes de la CPAP sobre la força muscular.	332
XIV.4.3. Efectes de la CPAP sobre l'estructura del son.	336
XIV.4.4. Efectes de la CPAP sobre la morfometria muscular.	337
XIV.4.5. Efectes de la CPAP sobre l'expressió gènica de les cadenes pesants de miosina.	338
XIV.4.6. Efectes de la CPAP sobre els mediadors de la inflamació.	338
XIV.5. DISCUSSIÓ SOBRE LES ASSOCIACIONS ENTRE VARIABLES. CORRELACIONS. ..	342
XIV.5.1. Grup Obesitat.	342
XIV.5.2. Grup MPOC.	343
XIV.5.3. Grup SAHS.	345
XIV.5.3.1. Correlacions basals.	345
XIV.5.3.2. Efecte de la CPAP.	346
XIV.5.4. Grup Overlap.	349
XIV.5.4.1. Correlacions basals.	349
XIV.5.4.2. Efecte de la CPAP.	352
XIV.6. ADDENDUM A L'APARTAT DE DISCUSSIÓ. CONSIDERACIONS SOBRE L'ESTRÈS OXIDATIU, L'ÒXID NÍTRIC I LA LEPTINA.	354
XIV.7. LIMITACIONS METODOLÒGIQUES DE LA PRESENT TESI DOCTORAL.	357
XIV.8. EXPECTATIVES DE FUTUR. IMPLICACIONS TERAPÈUTIQUES.	359

CONCLUSIONS.

XV. CONCLUSIONS.	365
-------------------------------	-----

BIBLIOGRAFIA.

XVI. BIBLIOGRAFIA.	371
---------------------------------	-----

INTRODUCCIÓ

Comentari preliminar.

Alguns temes tractats a l'actual tesi ja han estat extensament estudiats en els treballs precedents del nostre grup, tant en forma de tesi doctorals com en articles originals a diferents revistes mèdiques. A continuació exposem la major part dels estudis realitzats. En l'apartat de Bibliografia es poden trobar d'altres. Remetim al lector interessat a aquestes publicacions.

Aran X. Els músculs respiratoris a la síndrome d'apnees del son. (*Tesi Doctoral*). Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 1992.

Broquetas JM. Estructura y función de los músculos respiratorios en la EPOC: Efectos de la hipoxia, hiperoxia, hipercapnia, cambios posturales y ejercicio. (*Tesi Doctoral*). Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 1992.

Sauleda J. Correlaciones entre la estructura de los músculos respiratorios y la función respiratoria. (*Tesi Doctoral*). Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 1994.

Aguar MC. Estructura y función de los músculos respiratorios: Desarrollo de un modelo de biopsia ambulatoria. (*Tesi Doctoral*). Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 1995.

Orozco-Leví M. Cambios adaptativos en la estructura subcelular del diafragma humano: Asociaciones con la EPOC. (*Tesi Doctoral*). Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 1995.

Pastó M. Función respiratoria, proteínas estructurales y actividad enzimática del diafragma. (*Tesi Doctoral*). Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 1998.

Blanco ML. Capacidad oxidativa de los músculos respiratorios y periféricos en la EPOC. (*Tesi Doctoral*). Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 2003.

Martínez-Llorens J. Cèl.lules satèl.lit i miogènesi en els músculs esquelètics dels pacients amb MPOC. (*Tesi Doctoral*). Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 2004.

Coronell C. Disfunció muscular en malalts amb MPOC. (*Tesi Doctoral*). Barcelona: Universitat Pompeu Fabra; 2006.

Orozco-Levi M, Gea J, Monells J, Aguar MC, Broquetas JM. Activity of the *latissimus dorsi* muscle during inspiratory threshold loads. *Eur Respir J* 1995; 8: 441-445.

Gea J. Myosin gene expression in the respiratory muscles. *Eur Respir J* 1997; 10: 2404-2410.

Orozco-Levi M, Gea J, Aguar MC, Martin-Campos J, Broquetas JM. Changes in myosin expression in external intercostal muscles of COPD patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155 (suppl): A510.

Jiménez-Fuentes MA, Gea J, Pallás O, Gallego F, Félez MA, Broquetas JM. Morfometría fibrilar del músculo intercostal externo. Comparación entre los lados dominante y no dominante en pacientes con EPOC severa. *Arch Bronconeumol* 1998; 34: 189-193.

Barreiro E, Ferrer A, Hernández N, Palacio J, Broquetas JM, Gea J. Does respiratory function modulate the genetic expression of Myosin Heavy Chain isoforms in the diaphragm of COPD patients?. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157 (suppl): A670.

Arán X, Félez MA, Gea J, Orozco-Levi M, Sauleda J, Broquetas JM. Fuerza y resistencia de los músculos respiratorios en pacientes con SAHS. Efecto de la aplicación nocturna de CPAP. *Arch Bronconeumol* 1999; 35: 440-445.

Jiménez-Fuentes MA, Gea J, Aguar MC, Minguella J, Lloreta J, Félez M, Broquetas JM. Densidad capilar y función respiratoria en el músculo intercostal externo. *Arch Bronconeumol* 1999; 35: 471-476.

Gea J, Hamid Q, Czaika G, Zhu E, Mohan-Ram V, Goldspink G, Grassino A. Expression of myosin heavy-chain isoforms in the respiratory muscles following inspiratory resistive breathing. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1274-1278.

Pastó M, Gea J, Blanco ML, Orozco-Levi M, Pallás O, Masdeu MJ, Broquetas JM. Actividad metabólica del músculo intercostal externo en pacientes con EPOC. *Arch Bronconeumol* 2001; 37: 108-114.

Ramírez-Sarmiento A, Orozco-Levi M, Güell R, Barreiro E, Hernández N, Mota S, Sangenís M, Broquetas JM, Casan P, Gea J. Inspiratory muscle training in patients with chronic obstructive pulmonary disease: structural adaptation and physiologic outcomes. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 1491-1497.

Palacio J, Gáldiz JB, Bech JJ, Mariñán M, Casadevall C, Martínez P, Gea J. Expresión de los genes de la interleucina 10 (IL-10) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en músculos respiratorios y periféricos. Relación con el daño sarcolémico. *Arch Bronconeumol* 2002; 38: 311-316.

Coronell C, Ramírez-Sarmiento A, Martínez-Llorens JM, Barreiro E, Orozco-Levi M, Gea J. Cytokine expression in the external intercostal muscle of subjects with normal lung function. *Eur Respir J* 2002; 20 (suppl 38): 496s.

Coronell C, Martínez-Llorens JM, Ramírez-Sarmiento A, Orozco-Levi M, Barreiro E, Gea J. Cytokine expression at the external intercostals of healthy human beings. Effects of ageing, gender and exhaustive specific exercise. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167 (suppl): A27.

Casadevall C, Coronell C, Ramírez-Sarmiento A, Barreiro E, Orozco-Levi M, Gea J. Local expression of the gene encoding TNF-alpha in the external intercostal and quadriceps muscles of severe COPD patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167 (suppl): A29.

Casadevall C, Coronell C, Minguella J, Blanco ML, Orozco-Leví M, Barreiro E, Broquetas J, Gea J. Análisis estructural y expresión de los factores de necrosis tumoral y crecimiento insulina-*like* en los músculos respiratorios de los pacientes con EPOC. ¿Son válidas las muestras obtenidas en el curso de una toracotomía por neoplasia pulmonar localizada?. *Arch Bronconeumol* 2004; 40: 209-217.

Martínez-Llorens JM, Orozco-Leví M, Masdeu MJ, Coronell C, Ramírez-Sarmiento A, Broquetas JM, Gea J. Disfunción muscular global durante la exacerbación de la EPOC: Un estudio de cohortes. *Med Clin (Barc)* 2004; 122: 521-527.

Barreiro E, De la Puente B, Minguella J, Corominas JM, Serrano S, Hussain SNA, Gea J. Oxidative stress and respiratory muscle dysfunction in severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 1116-1124.

Casadevall C, Coronell C, Ramírez-Sarmiento AL, Martínez-Llorens J, Barreiro E, Orozco-Leví M, Gea J. Upregulation of pro-inflammatory cytokines in the intercostal muscles of COPD patients. *Eur Respir J* 2007; 30: 701-707.

Barreiro E, Nowinski A, Gea J, and Sliwinski P. Oxidative stress in the external intercostal muscles of patients with obstructive sleep apnoea. *Thorax* 2007; 62: 1095-1101.

Martínez-Llorens J, Casadevall C, Lloreta J, Orozco-Leví M, Barreiro E, Broquetas J y Gea J. Activación de células satélite en el músculo intercostal de pacientes con EPOC. *Arch Bronconeumol* 2008; 44: 239-244.

Casadevall C, Coronell C, Ausín P, Martínez-Llorens J, Orozco-Leví M, Barreiro E, Gea J y miembros del grupo ENIGMA in COPD. Citocinas inflamatorias y factores de reparación en los músculos intercostales de pacientes con EPOC grave. *Arch Bronconeumol* 2009; 45: 279-285.

I. EL MÚSCUL ESQUELÈTIC. ESTRUCTURA CEL·LULAR I MOLECULAR.

I.1. INTRODUCCIÓ.

El múscul és el teixit més abundant del cos humà, i destaca per la seva capacitat d'adaptació. Amb un entrenament intens podem aconseguir que la massa d'un determinat grup muscular es dupliqui o tripliqui. Per contra, la manca d'exercici pot fer que el volum d'un múscul minvi un 20% en tan sols dues setmanes (Andersen 2000).

A les pàgines que segueixen es descriuen els mecanismes cel·lulars i moleculars que ens permetran apropar-nos a la comprensió del teixit muscular i la seva gran plasticitat.

I.1.1. Hi ha tres tipus de múscul.

En el cos humà hi ha tres tipus de múscul: *estriat*, *cardíac* i *llis*.

El múscul estriat forma la gran massa de la musculatura somàtica. Presenta estries transversals ben desenvolupades i, en condicions normals, no es contrau en absència d'un estímul nerviós. En general es troba sota el control voluntari. El múscul estriat es diferencia del múscul cardíac, entre d'altres coses, en que no té connexions ni funcionals ni anatòmiques entre les fibres musculars individuals.

El múscul cardíac també presenta estriacions, però a més de funcionar com si fos un sinciti, conté cèl·lules "marcapàs" que descarreguen impulsos de manera espontània, el que provoca contraccions rítmiques encara que no tingui innervació externa.

El múscul llis es comporta com un sinciti, amb connexions entre les seves fibres, i també té cèl·lules "marcapàs", que en aquest cas presenten descàrregues que no són rítmiques. Observem una manca d'estries.

I.2. ESTRUCTURA CEL·LULAR DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC.

Les cèl·lules musculars, també anomenades *fibres*, estan disposades en paral·lel a l'eix del múscul, de manera que la força de contracció de les unitats és additiva. Cada fibra muscular és una cèl·lula única, multinucleada, llarga i cilíndrica. Està envoltada per una membrana cel·lular, el *sarcolemma*. No hi ha ponts sincitials entre les cèl·lules.

Les fibres musculars, com les neurones, poden ésser excitades per estímuls químics, elèctrics i mecànics per a produir un potencial d'acció que es transmet al llarg de la seva membrana cel·lular. Les fibres musculars posseeixen un mecanisme contràctil que s'activa pel potencial d'acció. Les proteïnes contràctils actina i miosina són les principals proteïnes que duen a terme la contracció muscular.

Un múscul esquelètic individual està format per feixos de fibres. Cada fibra té un diàmetre que oscil·la entre 10 i 80 micres, i la majoria són tan llargues com el propi múscul. Una fibra o cèl·lula muscular conté de cents a milers de miofibril·les, cadascuna de les quals té uns 1.500 filaments de miosina i 3.000 filaments d'actina (Guyton 2001).

La miosina forma els filaments gruixuts i l'actina els filaments fins. Ambdós s'estenen longitudinalment al llarg de la fibra muscular. Els filaments d'actina i miosina s'interdigiten entre si, donant lloc a les bandes clares i fosques típiques del múscul estriat. Dels filaments de miosina surten unes projeccions laterals: els ponts creuats. La interacció entre els ponts creuats i els filaments d'actina provoca la contracció.

Els extrems distals dels filaments d'actina es troben units als discs o línies Z, que són estructures proteiques disposades perpendicularment als filaments, que salten d'una miofibril·la a l'altre, unint-les. L'espai comprès entre dos discs Z és el *sarcòmer*, que és la unitat bàsica (funcional i estructural) de contracció. En situació de repòs el sarcòmer té una longitud màxima, que és d'unes 2 micres (Figura I.1.).

En el moment de la contracció els filaments d'actina llisquen sobre els de miosina donant lloc a un escurçament del sarcòmer. Aquest procés necessita energia, que s'obté de la hidròlisi de l'adenosina trifosfat (ATP). En tota fibra muscular hi ha un

gran nombre de *mitocondris*, on es sintetitza l'ATP, que es situen entre les miofibril·les, paral·lelament a les mateixes.

Un altre orgànu cel·lular de gran importància pel múscul és el reticle endoplasmàtic, que a les cèl·lules musculars s'anomena *reticle sarcoplasmàtic*, trobant-se molt desenvolupat. Els músculs de contracció més ràpida tenen un reticle sarcoplasmàtic més extens. Durant els processos de contracció i relaxació muscular es produeixen, respectivament, la sortida i l'entrada de calci del reticle sarcoplasmàtic.

I.2.1. La miosina.

La miosina ve ser la primera proteïna motora identificada (Alberts 2004). És la proteïna més abundant present a les cèl·lules musculars. Comprèn un 25% del total de proteïnes que hi ha a les fibres musculars. Aquesta proteïna motora es comporta tanmateix com un enzim, capaç de convertir l'energia química en mecànica, gràcies a la seva activitat ATPasa (Stevens 2006).

Els filaments gruixuts estan formats per múltiples molècules de miosina, cadascuna amb un pes molecular (PM) de 480.000. La molècula de miosina està constituïda per 6 cadena polipeptídiques: dues pesants, amb un PM aproximat de 200.000, i quatre cadenes lleugeres, amb un PM de 20.000 cada una. Les dues cadenes pesants s'enrotllen entre si per a formar una doble espiral. En un dels extrems cada cadena està plegada formant una massa proteica globulosa, que s'anomena cap de la cadena de miosina. El cap correspon a l'extrem N-terminal. Com cada molècula està formada per una doble espiral, hi hauran dos caps lliures de miosina a un dels pols de la molècula. L'altre extrem de l'espiral és la cua de la miosina (extrem C-terminal). Les 4 cadenes lleugeres formen part del cap de la molècula de miosina, dues a cada cantó. Durant la contracció muscular les cadenes lleugeres ajuden a regular la funció del cap de la miosina (Figura I.2.).

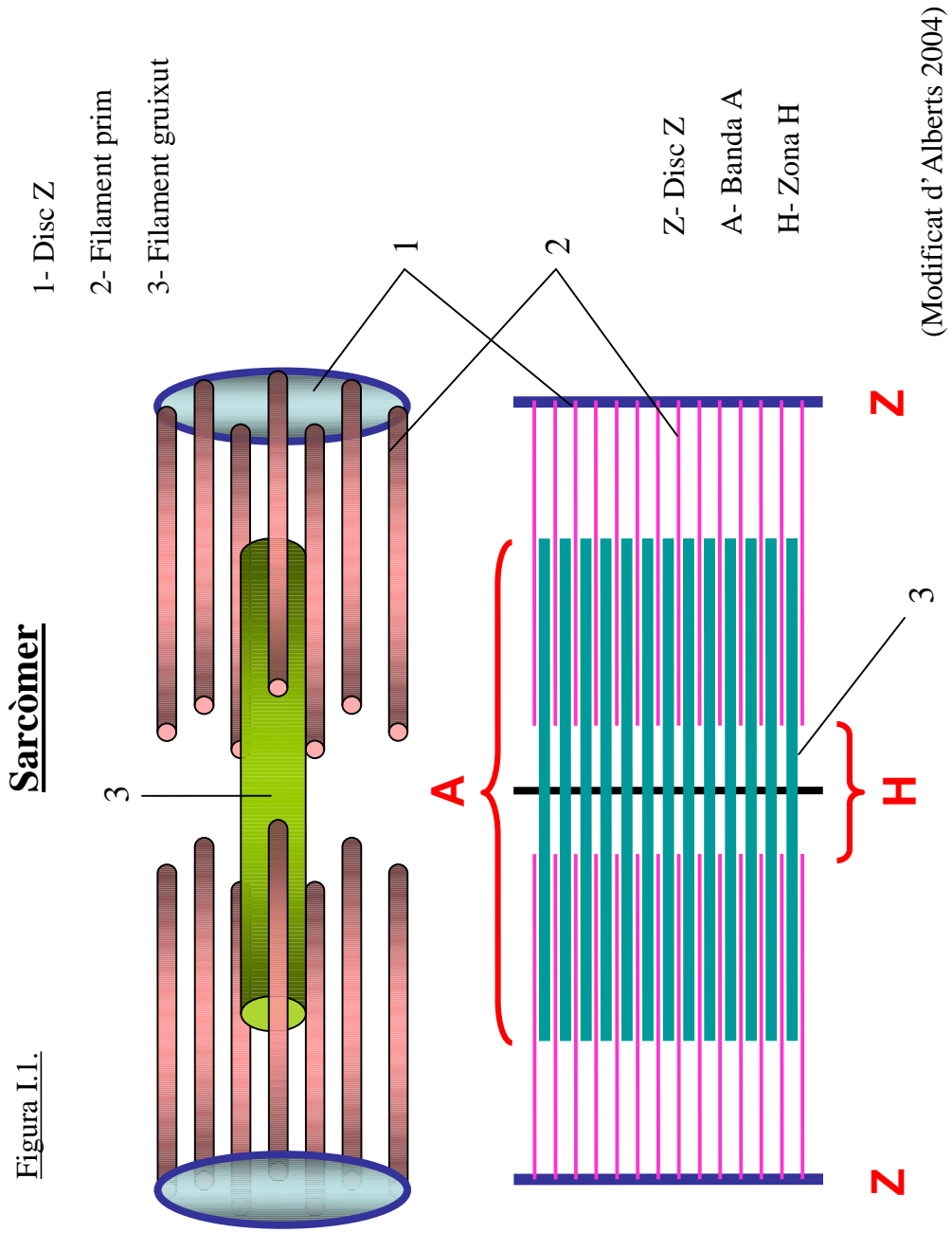
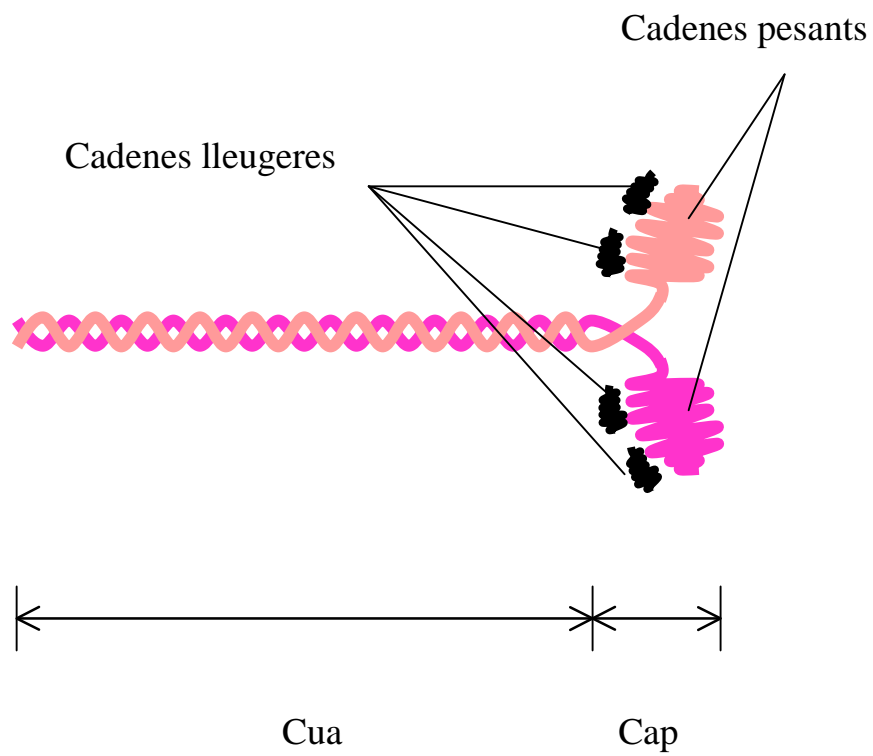


Figura I.2.**Molècula de miosina**

El filament gruixut està constituït per centenars de molècules individuals de miosina. Les cues de miosina s'agrupen entre si per a formar el cos del filament. Dels costats d'aquest cos penjen cap a l'exterior els nombrosos caps de la miosina. Una part de l'espiral de la cadena de miosina, la unida al cap, també es troba separada del cos del filament, formant el braç que penja cap a l'exterior simultàniament amb el cap. Aquests braços i caps que sobresurten de l'eix central del filament són els punts creuats, que interactuen amb l'actina. Hom pensa que cada pont creuat és flexible per dos punts nomenats frontisses. Un punt de flexió és al lloc on el braç deixa el cos del filament, i l'altre frontissa és a la zona on els dos caps s'uneixen al braç.

La llargada total del filament de miosina és de 1,6 micres. A la part central (medial) del filament només es troben cues de les molècules de miosina; és una zona nua. Aquesta part forma un engruiximent que dóna lloc a les línies M del sarcòmer. Els caps, amb els corresponents braços, es disposen perifèricament allunyant-se del centre del filament.

Per acabar, el filament de miosina està enrotllat sobre el seu eix, el que fa que cada grup de punts creuats es trobi separat axialment 120 graus respecte al grup anterior. Això garanteix que els punts creuats s'estenguin en totes les direccions al voltant del filament gruixut, possibilitant un major contacte amb els filaments d'actina.

Els caps de miosina poden funcionar com a enzim ATPasa, és a dir, trencar la molècula d'ATP i emprar l'energia alliberada pel fosfat d'alta energia en el procés de la contracció muscular.

I.2.1.1. Tipus de miosina.

Des de la identificació per primer cop de la molècula de miosina al múscul esquelètic (miosina II) s'han descrit 18 tipus diferents de miosina. Les miosines constitueixen una superfamília de proteïnes, que no solament estan presents en el múscul dels vertebrats, sinó també en diferents teixits i éssers vius, com són els protozous, les amebes, els llevats i les plantes.

Aquesta diversitat ve marcada per la diferent composició en els aminoàcids, tant de la cua com dels caps de la molècula de miosina. El genoma humà inclou 40 gens de miosina.

La miosina "convencional" s'anomena miosina II perquè té 2 caps, en contraposició a la miosina I, que es va descriure amb posterioritat, però que és un monòmer amb un sol cap. Les següents miosines que han anat apareixent han estat numerades segons l'ordre amb que han estat descobertes (Alberts 2004).

En contraposició a la miosina present en el múscul (miosina II), les miosines no musculars no formen filaments. Malgrat no intervinguin en la contracció muscular, estan involucrades en el moviment cel·lular, gràcies a la seva interacció amb l'actina. Participen en el transport de vesícules i orgànuls cel·lulars, en la fagocitosi, en la divisió cel·lular i, a les amebes, en l'extensió de pseudòpods.

I.2.1.2. La miosina condiona el tipus de fibra muscular.

Les cadena pesants de miosina (MyHC, de l'anglès *Myosin Heavy Chain*) determinen les característiques funcionals de la fibra muscular en els animals superiors. En l'individu humà adult existeixen tres principals isoformes o varietats de cadena pesants de miosina. Són la I, la IIa i la IIx. Les fibres musculars que contenen una determinada isoforma també s'anomenen així: I, IIa i IIx (Taula 1.1.). En els mamífers també existeixen les isoformes embrionària i neonatal de MyHC, així com la cardíaca alfa (α -MyHC) i les isoformes extraocular i mandibular o masticatòria (m-MyHC). Les MyHC embrionària i neonatal s'expressen predominantment en els músculs estriats en desenvolupament, però poden ser detectades en els músculs de l'adult en fibres que s'estan regenerant, o bé en músculs més especialitzats, com són el M. masseter i els M. extraoculars (Schiaffino 1996).

Taula I.1.

CLASSIFICACIÓ DE LES FIBRES MUSCULARS.

CARACTERÍSTIQUES FUNCIONALS				
Tipus de fibra	I	IIa	IIx	IIb*
CONTRACCIÓ	Lenta	Ràpida	Ràpida	Ràpida
FATIGA	Resistent	Resistent	Fatigable	Intermitja
CARACTERÍSTIQUES METABÒLIQUES				
	I	IIa	IIx	IIb*
METABOLISME	Oxidatiu	Oxidatiu-glicolític	Glicolític	Glicolític
EXPRESSIÓ de CADENES PESANTS de MIOSINA				
	I	IIa	IIx	IIb*
Expressió MyHC	MyHC I	MyHC IIa	MyHC IIx	MyHC IIb

*NOTA: Les fibres IIb no es troben presents en humans. La nomenclatura clàssica era confusa, doncs, s'utilitzava l'expressió "fibres IIb" per a definir aquelles que, com s'ha vist més recentment, expressen majoritàriament la isoforma IIx.

Les fibres de tipus I són també conegudes amb el nom de fibres "lentes", en contraposició a les fibres "ràpides" (IIa i IIx). La velocitat màxima de contracció d'una fibra IIx és deu vegades major que la d'una fibra de tipus I. La velocitat de contracció de les fibres IIa es troba a mig camí de les altres dues (Taula I.2.). Existeix una altra varietat de fibres, les IIb, que en condicions normals no s'expressen en els humans, malgrat el gen estigui present en el nucli de les seves cèl.lules musculars. Aquesta darrera isoforma de miosina la veiem en rates i petits mamífers que necessiten fugir a grans velocitats dels seus depredadors. Les fibres IIb es contrauen molt més depressa que les IIa i IIx (Andersen 2000). De fet, si existissin en els humans, probablement provocarien la ruptura dels elements musculoesquelètics.

Les velocitats de contracció de les fibres musculars depenen de la manera com descomposen la molècula d'ATP per a obtenir energia. Les fibres lentes presenten un metabolisme aeròbic, que les fa aptes per a exercicis de resistència, com són les carreres llargues, el ciclisme o la natació. Les fibres ràpides tenen un metabolisme anaerobi, que els hi proporciona una gran força i potència però durant un període curt de temps, tal i com succeeix a les carreres curtes (100 ó 200 metres) o l'halterofília.

A més dels tres principals tipus de fibres musculars esmentats, el múscul normal té formes híbrides, portadores de dues isoformes de miosina. En aquestes fibres híbrides observem un espectre continu que va des de les fibres quasi totalment formades per la isoforma lenta fins d'altres que quasi exclusivament estan constituïdes per la isoforma ràpida. Des d'un punt de vista funcional, la fibra es comportarà segons la isoforma predominant. En un adult sa i jove hi ha menys d'un 5% de fibres híbrides.

Taula I.2.**Característiques principals segons el tipus de fibra muscular:****Fibres ràpides:**

- són més grans (major diàmetre de la fibra)
- gran força de contracció
- reticle sarcoplasmàtic extens, que els permet alliberar gran quantitat de ions calci per a iniciar la contracció
- alta capacitat de bombeig del calci des del reticle sarcoplasmàtic
- grans quantitats d'enzims glucolítics, per a l'alliberament ràpid d'energia
- menor aport de sang, perquè el metabolisme oxidatiu té menys importància
- menor nombre de mitocondris (pel mateix motiu)
- se les anomena fibres blanques (amb poca mioglobina)
- contenen cadenes pesants de miosina de tipus ràpid (en humans, IIa i IIx)
- ràpida activitat ATPasa de l'isoenzim de la miosina

Fibres lentes:

- fibres musculars més petites
- major resistència a la fatiga
- innervades per fibres nervioses més petites
- vascularització més àmplia, amb major nombre de capil·lars, per tal de proporcionar quantitats extra d'oxigen
- mitocondris molt augmentats en nombre, el que afavoreix el metabolisme oxidatiu
- fibres amb gran contingut en mioglobina, que els hi dona un aspecte vermellós
- se les anomena fibres vermelles
- cadenes pesants de miosina lentes (de tipus I)

I.2.1.3. Miosina y expressió gènica.

S'entén com a "expressió" d'un gen el procés complet de síntesi d'una proteïna a partir d'aquest determinat gen. Així doncs, l'expressió del gen de la miosina comprendrà els processos de *transcripció* (còpia de l'ADN en ARN missatger –mRNA-) i *traducció* (formació de proteïna a partir del mRNA), fins a obtenir la molècula sencera de miosina.

El fenotip muscular és el resultat de la interacció entre el genoma i els estímuls ambientals. S'han identificat els gens que codifiquen les diferents isoformes de les cadenes pesants de miosina (MyHC). Formen una superfamília de gens en la que cada gen sembla codificar una única isoforma de MyHC de manera específica. El responsable de la isoforma lenta de miosina (tipus I) es troba al cromosoma 14, just al costat del que codifica la MyHC alfa cardíaca. En humans, els gens de les MyHC ràpides (IIa, IIb i IIx) i de les MyHC fetal i perinatal estan ubicats al cromosoma 17.

Els gens sofreixen la transcripció en diferents àcids ribonucleics missatgers (mRNA) que també són específics per a cada isoforma de MyHC. Utilitzant tècniques de *hibridació in situ* ha estat possible la identificació topogràfica d'aquests mRNA. Els mRNA de les MyHC s'han detectat predominantment a la perifèria de les fibres, al voltant dels nuclis (Gea 2000). S'han trobat concentracions més petites de mRNA a prop de les bandes A del sarcòmer. Això suggereix que el procés de traducció (pas de mRNA a proteïna) acaba a l'espai interfibril·lar, a la perifèria de la miofibril·la. La recent formada molècula de MyHC difon des d'allà i és incorporada a la banda A. Els estudis d'hibridació *in situ* també ens han confirmat l'heterogeneïtat de moltes fibres musculars, que co-expressen simultàniament gens que codifiquen isoformes diferents de MyHC.

I.2.1.3.a. Factors que regulen l'expressió gènica de les MyHC.

En models experimentals amb animals s'ha observat que en el moment de néixer els músculs esquelètic i cardíac són indiferenciats quant a les isoformes de MyHC que presenten i que, a mesura que creixen, assoleixen el grau de diferenciació que correspon al fenotip de MyHC adult. Així, doncs, al moment del naixement els

músculs esquelètics mostren una combinació de MyHC embrionària i MyHC neonatal, amb poques quantitats de MyHC de tipus I i IIa. Progressivament la miosina embrionària és substituïda per les formes adultes.

Les dades que disposem semblen indicar que les fibres musculars esquelètiques individualment considerades disposen de la maquinària genètica capaç d'expressar totes les isoformes de MyHC de l'adult. Possiblement seran les condicions ambientals les que facin que s'expressi predominantment una o una altra isoforma. Això els hi dóna una gran plasticitat que els permet dur a terme tota mena de moviments complexos (Baldwin 2001).

Els mecanismes que regulen l'expressió dels gens que codifiquen les MyHC no són ben coneguts, malgrat han estat estudiats activament. Hom creu que l'expressió gènica ve regulada fonamentalment per senyals mecàniques, i més concretament per canvis en la tensió generada pel múscul durant l'esforç. L'estirament (tensió activa) i l'estimulació elèctrica (tensió passiva) provoquen la repressió dels gens de miosina de tipus ràpid, amb l'activació dels gens de tipus lent. Això implica la progressiva transformació de fibres musculars ràpides en lentes, no pas per la substitució d'unes fibres velles per altres de noves, sinò per canvis en l'expressió molecular de les isoformes de MyHC (Gea 1997).

Com a norma general podríem dir que els gens de tipus ràpid s'expressarien per defecte, mentre que els gens de tipus lent ho farien com a resposta a canvis en les càrregues musculars. Així doncs, resulta que una disminució o una manca d'activitat dóna lloc a una major expressió de MyHC ràpides (Gea 2000).

Nogensmenys, el tipus d'activitat física també influeix l'expressió de MyHC. Per exemple, els exercicis aeròbics desencadenen l'expressió de MyHC lentes, mentre que l'aixecament de peses indueix l'expressió de fibres ràpides.

Tant l'aixecament de peses com el repòs afavoreixen l'expressió de MyHC ràpides, però amb diferències. L'entrenament anaeròbic (peses) provoca l'expressió d'isoformes ràpides de MyHC en les fibres musculars ràpides, que es tornen hipertròfiques. En canvi la inactivitat comporta l'augment de l'expressió d'isoformes

ràpides de miosina en tota la població de fibres musculars. La manca d'activitat pot portar el múscul a l'atròfia.

Si bé hom pensa que les senyals mecàniques són el principal estímul capaç d'induir canvis en l'expressió gènica de les MyHC, hi ha altres factors que la regulen. S'han descrit canvis en les isoformes de MyHC provocats per substàncies hormonals (corticoides i hormones tiroïdals); per factors nutricionals (dèficits dietètics); per factors derivats del control neural; per l'edat (envelliment); pel sexe; i pel grau de desenvolupament (Gea 2000).

En els darrers anys, s'ha fet especial èmfasi en la regulació de l'expressió gènica de MyHC deguda a les *hormones tiroïdals* i als *estímuls mecànics*, tant en el múscul estriat perifèric com en el múscul cardíac (Baldwin 2001). La tiroxina pot actuar independentment o de manera sinèrgica amb l'activitat mecànica per regular l'expressió dels gens de MyHC. El control d'aquesta expressió gènica de MyHC ve regulat per factors transcripcionals. Això no obstant, els mecanismes pels quals les hormones tiroïdals i els estímuls mecànics efectuen el seu control sobre els processos transcripcionals semblen ser diferents.

Tant l'activitat física com l'estat de les hormones tiroïdals poden provocar profundes transicions en el fenotip de MyHC. Ja s'ha comentat com sota condicions de descàrrega o de reducció de l'activitat física el múscul esquelètic presenta una conversió de fibres lentes en fibres ràpides. Aquest desplaçament cap a les isoformes de MyHC més ràpides també es veu en situacions d'hipertiroïdisme. Per contra, s'observa una conversió de fibres ràpides en fibres lentes quan els músculs són sotmesos a sobrecàrrega crònica o a càrregues intermitents, tal i com succeeix en els programes d'entrenament de resistència. Novament, la funció tiroïdal, en aquest cas la hipofunció, produeix un efecte similar de desplaçament de fibres ràpides cap a les isoformes lentes de MyHC.

Es desconeix quina és la intensitat específica de l'estímul capaç de desencadenar canvis en l'expressió gènica de les MyHC. Encara que fins i tot càrregues moderades poden donar lloc a modificacions en dita expressió, no es coneix el mínim llindar requerit per a induir aquestes transformacions. En general, la intensitat i la velocitat dels canvis varien d'una espècie animal a l'altre. Un factor a considerar és la

duració de l'estímul necessària per a provocar la transformació. En animals adults s'han observat canvis després de períodes d'estimulació extremadament curts.

Hem vist com els canvis en la tensió generada pel múscul durant l'esforç serien el fenomen inicial que donaria lloc a canvis en l'expressió gènica, que es traduirien en la transformació fenotípica de les fibres musculars (per exemple, pas de fibres de tipus I a tipus II). Però, quin és el mecanisme pel qual la senyal mecànica inicial dóna lloc a canvis en l'expressió genètica de les MyHC? No se sap. És possible que hi estigui implicat algun mediador dels que actuen a les primeres fases del desenvolupament (*miogenina* i/o *MyoD*). També s'ha proposat que el descens persistent en el potencial de fosforilació del sistema de l'ATP hi podria jugar un paper en la transformació de les MyHC. Ja fa uns anys, s'han clonat el factor de creixement, l'*insulin-like growth factor-1* (IGF-1) i la seva variant el *mechano growth factor* (MGF), a partir de músculs sotmesos a estirament o que presentaven un dany sostingut, que podrien participar en aquest modelatge genètic. D'altra banda, en el múscul diafragma de gossos sotmesos a càrregues inspiratòries moderades, s'ha descrit dany (microlesions) a nivell de la membrana muscular i al sarcòmer (Zhu 1997). És interessant remarcar que les fibres de tipus II es mostren més susceptibles al dany que les fibres lentes. Aquest dany coexisteix amb canvis en l'expressió gènica de les MyHC, i amb la presència del més amunt esmentat factor de creixement. Malgrat no estigui plenament demostrada, podria existir una relació entre el dany muscular i els canvis en l'expressió de les MyHC. El dany podria ser el prerequisit per al remodelatge muscular després d'aplicar càrregues resistives inspiratòries, i podria promoure el viratge cap a isoformes de MyHC més resistents.

I.2.1.3.b. Expressió gènica de les MyHC i músculs respiratoris.

Els músculs respiratoris (MMRR) són músculs estriats i, per tant, és d'esperar que la seva resposta (funcional i estructural) en front d'estímuls externs sigui semblant a la dels músculs esquelètics perifèrics com, per exemple, els músculs de les extremitats en condicions d'entrenament físic. La gran plasticitat dels músculs es tradueix en una capacitat d'adaptar la seva estructura a les seves necessitats funcionals, malgrat aquestes estiguin sotmeses a canvis. S'ha descrit que els músculs sotmesos a entrenament poden augmentar el tamany de les seves fibres, canviar la

composició de les seves proteïnes estructurals, i modificar les seves característiques metabòliques. Els MMRR, en tant que són músculs esquelètics, també poden patir aquests processos de remodelatge (Gea 1997).

Hem vist com la presència d'una varietat determinada de MyHC en un múscul, condicionava la activitat de l'ATPasa, la màxima velocitat d'escurçament de la fibra, el metabolisme de la cèl.lula i la seva resistència a la fatiga.

La capacitat d'adaptació dels músculs a diverses circumstàncies ha estat estudiada abastament en la medicina esportiva i a les malalties cardíques. Hi ha pocs estudis que ho hagin avaluat en el camp dels MMRR. En general, els resultats són similars als observats en altres músculs esquelètics sotmesos a càrregues. El múscul respiratori més estudiat ha estat el diafragma. El nostre grup disposa d'alguns estudis que han analitzat l'estructura i la funció dels M. intercostals externs (Orozco-Levi 1997, Jiménez-Fuentes 1998, Pastó 2001, Barreiro 2007, Casadevall 2007, Casadevall 2009).

L'expressió de les isoformes de MyHC al diafragma, varia d'unes espècies animals a les altres. En general, en humans el tant per cent de fibres ràpides i lentes no difereix molt. A més, en models animals (gossos) la distribució de fibres és homogènia, sense diferències significatives entre les porcions costal i crural del diafragma. Ja hem comentat anteriorment que el diafragma sembla tenir una proporció important de fibres amb abundància d'enzims oxidatius, la qual cosa li proporciona una gran resistència a la fatiga.

En models animals, un entrenament físic general, per molt perllongat que sigui, es tradueix en canvis només moderats en les característiques cel.lulars i moleculars del diafragma. A més, els canvis semblen afectar exclusivament la porció costal del diafragma. Per contra, el nostre grup ha evidenciat que un entrenament específic (no general) és capaç de provocar modificacions molt importants en l'estructura d'aquest múscul. Fent respirar gossos contra nivells moderats de càrregues inspiratòries hem observat un increment en l'expressió dels gens que codifiquen les MyHC lentes (Gea 2000). Això es manifesta tant en la porció costal com en la crural del diafragma. Probablement, al sotmetre el múscul a càrregues inspiratòries intermitents es comporta com un entrenament de resistència, amb resultats similars en l'expressió de MyHC. Els avantatges d'aquests canvis adaptatius (major expressió de isoformes lentes) serien un

cost energètic menor per a mantenir una tensió similar i una major resistència a la fatiga. Però no tot és beneficiós: el diafragma resultant ha perdut velocitat de contracció i força.

I.2.2. L'actina.

L'actina va ser aïllada per primer cop a les cèl.lules musculars l'any 1942. D'antuvi hom pensava que aquesta proteïna només estava relacionada amb la contracció muscular. Avui dia sabem que és una proteïna molt abundant a totes les cèl.lules eucariotes i que, per tant, no és exclusiva de les fibres musculars. Totes les actines dels organismes eucariotes són molt semblants en la seva seqüència d'aminoàcids (Cooper 2007).

En els mamífers hi ha 6 gens diferents per a l'actina. Quatre s'expressen en diversos tipus de músculs, i dos en cèl.lules no musculars.

Podríem resumir les funcions de l'actina dient que:

- és una proteïna constitutiva del *citoesquelet cel.lular* de totes les cèl.lules eucariotes, i que
- forma part de *l'estructura motora* de les fibres musculars.

El citoesquelet és una xarxa de filaments proteics distribuïts per tot el citoplasma cel.lular. Està format per 3 tipus de filaments: els *filaments d'actina*, els *microtúbuls* i els *filaments intermitjos*. El citoesquelet proporciona el suport mecànic a la cèl.lula, participa en el moviment cel.lular i en el transport d'òrgànuls i materials d'una banda a l'altra de la cèl.lula, i participa en el moviment dels cromosomes durant la mitosi.

I.2.2.1. Actina i fibra muscular.

L'actina muscular és una proteïna globular (actina G), amb un PM de 42.000, composta per 375 aminoàcids. L'actina suposa el 12 % del total de proteïnes presents en el múscul esquelètic, i un 20 % de les proteïnes miofibril·lars (Stevens, 2006).

En el múscul, el filament fi o d'actina està constituït per tres components diferents: *l'actina*, la *tropomiosina*, i la *troponina*.

La columna vertebral del filament d'actina és una molècula de la proteïna actina E, de cadena doble. Els filaments estan enrotllats en una espiral amb una revolució completa cada 70 nanòmetres.

Cada banda de la doble hèlix de l'actina F està formada per molècules polimeritzades d'actina G. Hi ha aproximadament unes 13 molècules d'actina G a cada revolt de cada banda de l'hèlix, i existeix una molècula d'ADP unida a cadascuna de les molècules d'actina G. Hom creu que les molècules d'ADP són els punts actius dels filaments d'actina, on els ponts creuats dels filaments de miosina intervenen per a provocar la contracció del múscul. Les zones actives de les dues bandes d'actina F de la doble hèlix es troben esglaonades, de forma que hi ha un lloc actiu sobre el filament global d'actina cada 2,7 nanòmetres (Guyton 2001).

Cada filament d'actina té una longitud d'una micra. Per la seva base aquests filaments estan fortament inserits als discs Z. Els altres extrems del filament fan protusió en totes dues direccions cap als sarcòmers adjacents, situant-se en els espais que hi ha entre les molècules de miosina.

El filament d'actina també conté la proteïna tropomiosina, que té un PM de 70.000 i una longitud de 40 nanòmetres. Les molècules de tropomiosina són llargs filaments ubicats en el solc que es troba entre les dues cadenes d'actina. Les molècules de tropomiosina s'uneixen de manera laxa amb les bandes d'actina F i es disposen en espiral als costats de l'hèlix d'actina F. Hom pensa que, en estat de repòs, les molècules de tropomiosina descansen sobre el vèrtex de les zones actives de les bandes d'actina, de manera que no pot produir-se l'atracció entre els filaments d'actina

i miosina necessària per a la contracció. Cada molècula de tropomiosina cobreix al voltant de 7 llocs actius. Aquesta proteïna tindria, doncs, una acció inhibidora.

Dins del filament d'actina, i molt a prop d'un dels extrems de la molècula de tropomiosina, trobem unida una altra proteïna: la troponina. Les molècules de troponina són petites partícules globulars situades a intervals al llarg de les molècules de tropomiosina. Es tracta realment d'un complex de tres subunitats proteiques unides laxament, amb uns PM que oscil·len entre 18.000 i 35.000. Cada subunitat té un paper específic en el control de la contracció muscular. La troponina I presenta una forta afinitat per l'actina, i hom pensa que inhibeix la interacció de la miosina amb l'actina; la troponina T té una gran afinitat per la tropomiosina, i es creu que uneix els altres components de la troponina amb la tropomiosina; i la troponina C pels ions calci. Hom creu que la forta afinitat de la troponina C pels ions calci inicia el procés de la contracció. També es pensa que el complex proteic de les troponines uneix la tropomiosina a l'actina.

I.2.3. Altres proteïnes presents en el múscul esquelètic.

Apart de l'actina i la miosina existeixen altres proteïnes estructurals en la fibra muscular. Es tracta de proteïnes accessòries, que mantenen l'arquitectura de la miofibril·la i li proporcionen elasticitat. La velocitat i la potència de la contracció muscular depenen de la disposició dels filaments primers i gruixuts. Aquests han de estar situats entre si a una distància òptima i en una alineació correcta. Això és possible gràcies a més d'una dotzena de proteïnes estructurals, les més importants de les quals anem a comentar.

Els filaments primers o d'actina es troben ancorats pels seus extrems "més" en els discs Z, on es mantenen per proteïnes que formen una trama quadrangular, entre les que destaquen la *CapZ* i l'*alfa-actinina* (Alberts 2004). La α -actinina, que entrecreu l'actina, és una molècula de PM 190.000, abundant a la majoria de les cèl·lules animals.

Els filaments de miosina també són mantinguts mitjançant una trama (aquest cop hexagonal) a través de proteïnes associades que s'uneixen a la zona mitja, al llarg dels filaments gruixuts.

La *titina*, que té un PM de 3×10^6 , és el polipèptid més gran descrit fins ara. Les molècules gegants de titina, com si fossin cordes, s'estenen des dels filaments gruixuts (línia M) fins als discs Z. Hom creu que actuen mantenint els filaments de miosina ben centrats al sarcòmer. A més a més, és una proteïna elàstica que actua com un moll cel·lular. El seu desplegament i replegament molecular permet la recuperació de la fibra muscular després de la contracció.

La *nebulina* també és molt gran i està íntimament associada amb els filaments d'actina, formant filaments de la mateixa llargada que un filament prim (Cooper 2007). Està formada quasi enterament per una seqüència repetida de 35 aminoàcids que s'uneixen a l'actina. Cada molècula de nebulina s'estén des d'un extrem a l'altre del filament d'actina, és a dir, des del disc Z fins l'extrem intern o "menys", situat a prop del centre del sarcòmer. Es pensa que la nebulina determina la longitud exacte del filament d'actina, com si fos un regle molecular, capaç de regular l'acoblament de l'actina.

Els extrems "menys" dels filaments primers, és a dir, els extrems on hi ha el grup carboxil o C-terminal, estan encasquetats per una altra proteïna, la *tropomodulina*, que els proporciona una gran estabilitat. És ben coneguda la variabilitat dels filaments d'actina a nivell del citoesquelet, amb gran dinamisme per a formar i desfer els polímers d'actina. Per contra, en les miofibril·les, la disposició basal dels filaments d'actina ha de romandre constant. A nivell del sarcòmer, la tropomodulina podria ser l'encarregada de donar una gran estabilitat que garanteixi l'estructura dels filaments primers.

Les miofibril·les s'uneixen les unes amb les altres, costat amb costat, mitjançant un sistema de filaments intermitjos de *desmina*, i tota aquesta estructura queda ancorada a la membrana plasmàtica de la cèl·lula muscular per mitjà de diferents proteïnes, com la *distrofina*, que forma un complex en associar-se amb altres molècules.

El complex distrofina-glicoproteïna. La distrofina és una proteïna gran (PM de 427.000) que forma un bastó que connecta els filaments fins d'actina amb dues proteïnes del sarcolemma o membrana cel·lular. Aquestes darreres proteïnes de la membrana s'uneixen a una molècula d'adhesió anomenada *laminina* a la matriu extracel·lular. Les dues proteïnes del sarcolemma són distroglicans *alfa* i *beta* que, tanmateix, es relacionen amb les glicoproteïnes *alfa* i *beta* transmembranals i el sarcoglicà *gamma*. Sembla ser que tot aquest complex distrofina-glicoproteïna proporciona suport estructural i força a la miofibril·la. És interessant assenyalar la importància d'aquest complex, perquè les seves alteracions congènites ocasionen les diferents formes de *distròfia muscular*.

En resum, podem destacar les següents proteïnes que hi ha en el múscul esquelètic:

La forma de miosina present en el múscul esquelètic és la miosina II, que és una proteïna que està constituïda per dos caps globulars i una cua llarga. Dóna lloc als filaments gruixuts i és el veritable "motor cel·lular". Hi han diverses isoformes adultes que condicionen els tipus fibril·lars.

Ja hem descrit les característiques moleculars de l'actina G, la tropomiosina i la troponina que són les 3 proteïnes que formen els filaments primers.

La titina és una proteïna gegant que connecta les línies Z amb les línies M del centre del sarcòmer, proporcionant suport estructural i elasticitat.

La nebulina està íntimament associada amb els filaments d'actina, regulant la seva llargada.

L'alfa-actinina i la proteïna CapZ permeten l'anclatge dels filaments d'actina a les bandes Z del sarcòmer.

La tropomodulina s'uneix a l'actina i li dóna estabilitat.

I.3. EL PROCÉS DE LA CONTRACCIÓ MUSCULAR.

A continuació resumirem el mecanisme general de la contracció muscular per, més endavant, entrar més en detall en les fonts d'energia que fan possible aquest procés.

L'inici de la contracció d'un múscul ve donat per un potencial d'acció (PA) que viatja per la membrana d'un nervi motor fins arribar a les seves terminacions a les fibres musculars. A cada terminació (placa motora) el nervi secreta una petita quantitat del neurotransmissor acetilcolina. En ésser alliberada, l'acetilcolina obre múltiples canals a les proteïnes de la membrana muscular. L'obertura dels canals d'acetilcolina permet que grans quantitats de ions sodi entrin a l'interior per la membrana de la cèl.lula muscular, en el punt de la terminació nerviosa. Aquest fet inicia un PA a la fibra muscular que viatjarà per la membrana de la cèl.lula muscular de la mateixa manera que viatgen els PA per les membranes dels nervis.

El PA despolaritza la membrana de la fibra muscular i també viatja en profunditat a l'interior de la cèl.lula, on fa que el reticle sarcoplasmàtic alliberi cap a les miofibril.les grans quantitats de ions calci que estaven emmagatzemats en el reticle. Els ions calci inicien forces d'atracció entre els filaments d'actina i miosina, fent que llisquin entre si, la qual cosa constitueix el procés de la contracció.

Després d'una fracció de segon els ions calci són bombejats novament a l'interior del reticle sarcoplasmàtic, on quedaran emmagatzemats fins a l'arribada d'un nou PA al múscul. La retirada dels ions calci de les miofibril.les fa que s'acabi la contracció muscular.

Per a dur a terme tot aquest procés fa falta energia, que procedeix dels *enllaços d'alta energia* de l'ATP, que és degradat a ADP.

I.3.1. Contracció muscular. Fonts d'energia.

Estudiem ara, amb més detall, quines són les fonts d'energia requerides per a la contracció muscular.

La major part de l'energia proporcionada per l'ATP es necessita per activar l'anomenat mecanisme de "pas a pas", pel qual els ponts de miosina traccionen dels filaments d'actina, donant lloc a l'escurçament del sarcòmer. Però també faran falta petites quantitats d'energia per a bombejar calci des del sarcoplasma fins al reticle sarcoplasmàtic una vegada s'ha acabat la contracció; i per bombejar ions sodi i potassi a través de la membrana cel.lular, per tal de mantenir un ambient iònic adequat per a la propagació dels potencials d'acció (Guyton 2001).

La concentració d'ATP present a la fibra muscular és de 4 mM. aproximadament, i tan sols és capaç de mantenir una contracció completa durant 1 o 2 segons. Una vegada que l'ATP s'ha desdoblada en ADP, aquest ADP és refosforilat en una fracció de segon. Per aconseguir aquesta refosforilació existeixen diverses fonts d'energia.

La primera és la fosfocreatina, que és una substància portadora d'un enllaç d'alta energia similar al de l'ATP. Al ser desdoblada, la fosfocreatina dóna lloc a l'alliberament d'energia que permet la unió d'un nou fosfat amb l'ADP per a reconstituir la molècula d'ATP. Malauradament, la quantitat total de fosfocreatina també és molt petita, solament unes 5 vegades més que la d'ATP. Tant és així que l'energia combinada de l'ATP emmagatzemat i de la fosfocreatina solament és capaç de produir una contracció muscular màxima durant 5 a 8 segons.

Hi ha una altra font important d'energia que pot ser utilitzada per a reconstituir l'ATP com la fosfocreatina: el glicogen. El glicogen és un polímer de glucosa, i es troba emmagatzemat a les cèl.lules musculars (a més del fetge). La seva degradació enzimàtica ràpida (glicòlisi) dóna lloc als àcids làctic i pirúvic, alliberant-se energia que permet convertir l'ADP en ATP. Aquest pot servir per a reconstituir la fosfocreatina o bé pot utilitzar-se directament com a font d'energia durant la contracció muscular. Les reaccions glucolítiques succeeixen fins i tot en absència d'oxigen, de manera que durant un període curt de temps es pot mantenir la contracció muscular quan no hi ha

oxigen disponible. A més, la velocitat de formació d'ATP en el procés glicolític és 2,5 vegades més ràpida que la síntesi d'ATP a partir del metabolisme oxidatiu. Hi ha, no obstant, un inconvenient quan s'empra aquesta via metabòlica. S'acumulen tants productes finals de la glucòlisi a les cèl·lules musculars que la contracció màxima no es pot perllongar més enllà d'un minut.

La tercera i més important font d'energia és el metabolisme oxidatiu. És la combinació de diferents substractes nutricionals cel·lulars amb l'oxigen per a obtenir ATP. Més del 95% de l'energia utilitzada pel múscul per mantenir contraccions prolongades deriva d'aquesta font. Els substractes consumits són els carbohidrats, els lípids i les proteïnes. Quan l'activitat muscular dura molt (hores) la major part de l'energia procedeix dels greixos. Però, per a períodes de 2 a 4 hores la meitat de l'energia pot procedir del glicogen emmagatzemat, abans no s'acabin les seves reserves cel·lulars.

I.3.2. Detalls de la contracció muscular.

En un múscul normal en estat de relaxació els punts actius del filament d'actina estan inhibits o coberts físicament pel complex troponina-tropomiosina. Això impedeix la unió espontània i instantània que es produiria entre els punts actius del filament d'actina i els caps de les molècules de miosina. Però, en presència de ions calci, aquests es combinen amb la troponina C, donant lloc a un canvi en la conformació del complex troponina-tropomiosina, produint-se un desplaçament de la molècula de tropomiosina que deixa al descobert els punts actius de l'actina, el que facilita l'atracció dels caps dels ponts dels filaments de la miosina cap als esmentats punts actius, iniciant-se la contracció muscular.

La hipòtesi més acceptada per a explicar la interacció entre l'actina i la miosina és la teoria del "pas a pas" de la contracció muscular. Quan el cap de miosina s'uneix al punt actiu de l'actina es produeixen canvis profunds en les forces intramoleculares entre el cap i el braç del pont creuat. Això fa que el cap s'inclini cap avall i arrastri al filament d'actina cap a l'interior del sarcòmer. Aquesta inclinació del cap s'anomena "cop de força". Immediatament després de produir-se la seva inclinació, el cap de miosina es separa automàticament del punt actiu de l'actina, per tornar a la seva

direcció perpendicular normal. En aquesta posició es combina amb un nou punt actiu del filament d'actina, fins a tornar a inclinar-se en un nou cop de força, fent que el filament d'actina avanci un nou pas. Per tant, els caps dels ponts de miosina es mouen endavant i endarrera, caminant pas a pas al llarg del filament d'actina, i provocant l'atracció dels extrems dels filaments d'actina cap al centre del filament de miosina. Això dóna lloc a un escurçament del sarcòmer.

Per acabar amb el repàs de la contracció muscular, podem descriure d'una manera esquemàtica la seqüència de canvis mitjançant els quals la molècula de miosina es desplaça al llarg d'un filament d'actina:

1. Inicialment la miosina està unida al filament d'actina.
2. Una molècula d'ATP s'adhereix al cap de miosina.
3. S'hidrolitza l'ATP.
4. El cap de miosina canvia la seva conformació i fa un moviment de desplaçament.
5. El cap de miosina es fixa a un nou lloc del filament prim.
6. La molècula de miosina torna a la seva posició original, arrastrant el filament d'actina.
7. El sarcòmer s'escurça.
8. El resultat final és la contracció de la fibra muscular.

II. ELS MÚSCULS RESPIRATORIS.

Els músculs respiratoris del cos humà són músculs estriats.

Els músculs (M) estriats de l'organisme es poden dividir en músculs de les extremitats o *perifèrics*, músculs fonamentalment *posicionals* i músculs *respiratoris* (MMRR). Els M. perifèrics juguen un paper primordial en la locomoció. Els M. esquelètics del tronc, entre d'altres, participen activament en el manteniment de la postura corporal. Els MMRR són M. especialitzats encarregats de facilitar l'entrada i sortida d'aire als pulmons. Hi ha altres M. amb unes funcions que també són molt específiques, com són els M. extraoculars i els de la musculatura orofacial o laríngia. El seu estudi s'escapa dels objectius del present treball.

Donat que els MMRR són músculs esquelètics és d'esperar que la seva resposta (funcional i estructural) en front d'estímuls externs sigui semblant a la dels M. esquelètics perifèrics. Però els MMRR tenen una característica que els fa únics entre tots els M. estriats: la capacitat de treballar durant tota la vida sense un període llarg de repòs (McKenzie 2006). Això implica una extraordinària resistència a la fatiga. Hom pensa que aquesta important diferència funcional entre els MMRR i els altres M. estriats de l'organisme pot tenir una traducció a nivell cel.lular i molecular.

La biologia cel.lular dels músculs estriats ha estat exposada en el capítol inicial d'aquest treball. En el present capítol revisarem l'estructura i funció dels M. intercostals i les seves relacions amb els altres MMRR i les estructures de la caixa toràctica.

II.1. ESTUDI DELS MÚSCULS RESPIRATORIS.

Des de les primeres descripcions anatòmiques sobre el tema els músculs que intervenen en la respiració s'han dividit en M. inspiratoris i M. espiratoris.

II.1.1. Els músculs inspiratoris.

El principal M. inspiratori és el *diafragma*. Malgrat havia estat discutit, avui dia el *M. intercostal extern* és considerat un M. netament inspiratori. Aquesta activitat

inspiratòria és més marcada a nivell de la part posterior dels espais intercostals més cranials i, com veurem a continuació, va disminuint progressivament en direcció caudal. Els intercostals externs contribueixen a l'esforç inspiratori de forma progressiva, sobretot a mesura que s'incrementen les càrregues. Però, per alguns autors, fins i tot actuarien durant la inspiració tranquil·la en situació de repòs. Com veurem més endavant, els *intercostals parasternals* també tenen una acció inspiratòria.

En la inspiració profunda, o quan els MMRR són sotmesos a càrregues respiratòries, es recluten els músculs accessoris de la inspiració (Guyton 2001), com són:

- Els *escalens*, que eleven les dues primeres costelles
- Els *esternocleidomastoïdals*, que traccionen de l'estèrnium cap amunt
- El *serrats anteriors*, que fan pujar moltes costelles
- Fins i tot, el *dorsal ample* s'activa durant la inspiració (Orozco 1995)

II.1.2. Els músculs espiratoris.

Donat que l'inspiració és un procés eminentment passiu, la participació dels M. espiratoris durant l'inspiració en repòs, en un subjecte sa, és escassa o quasi bé nul·la. Quan es produeix una espiració forçada, és a dir, quan s'incrementen les demandes del sistema, hi intervenen els següents músculs:

- *Intercostals interns* (tret de la seva porció parasternal)
- Musculatura abdominal: *M. recte de l'abdomen*, *M. oblic major*, *M. oblic menor* i *M. transvers de l'abdomen*
- Segons altres autors també hi participarien el *serrats* i els *pectorals*

Encara que el present treball es centra en l'estudi del múscul M. intercostal extern, per a una millor comprensió comentarem conjuntament l'anatomia i la funció, no solament dels M. intercostals (MMII), sinò de tot el grup muscular de la pared anterolateral del tòrax.

II.2. ANATOMIA DELS MÚSCULS INTERCOSTALS.

Els MMII són un grup muscular situat a la paret anterolateral del tòrax. Ocupen els espais intercostals i estan disposats en tres plans per a cadascun dels espais intercostals: un pla més extern, format pel *M. intercostal extern* i el *M. elevador de la costella*; un pla intermig, constituït pel *M. intercostal intern* i la seva continuació ventral, el *M. intercostal parasternal*; i un pla interior integrat per dos músculs, el *M. intercostal íntim* i el *M. subcostal*. Cadascun dels MMII només ocupa una part de la extensió de l'espai intercostal que li correspon.

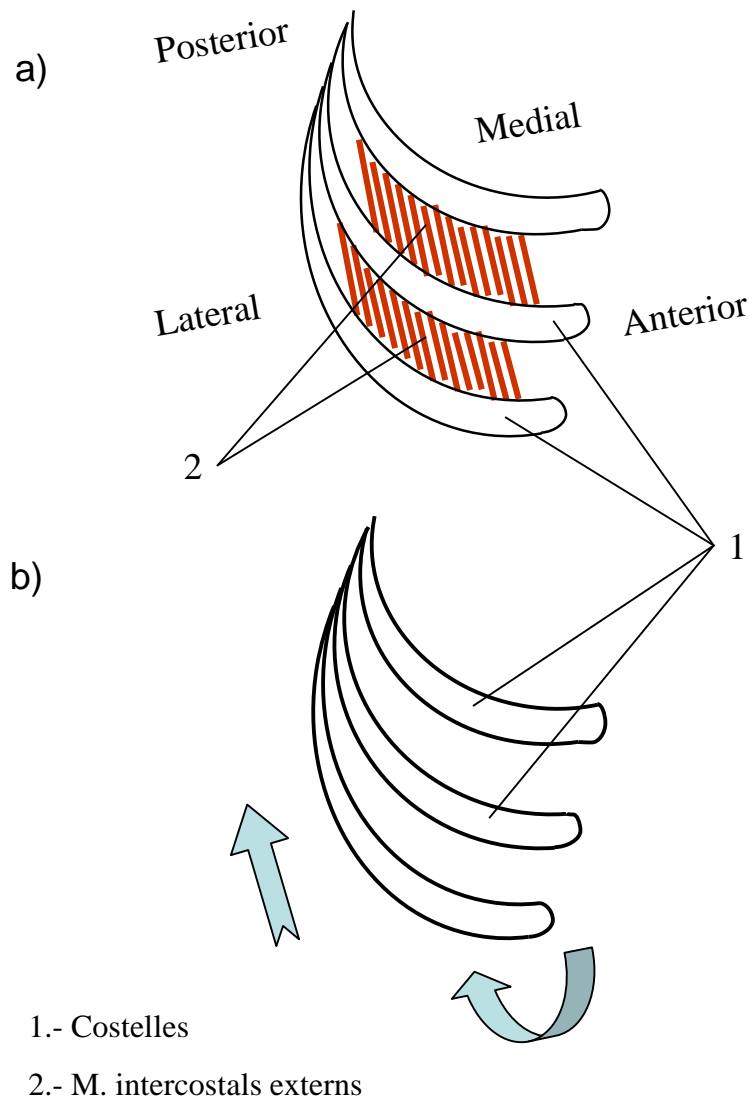
El M. intercostal extern està format per feixos paral·lels disposats obliquament en direcció inferoanterior. Les fibres musculars s'insereixen, per una part, en el llavi extern del solc costal de la costella superior i, per l'altre, en el llavi extern del marge superior de la costella inferior de l'espai intercostal (Figura II.1.). El M. intercostal extern no ocupa tota l'extensió de l'espai intercostal. La seva inserció comença posteriorment a la articulació costotransversa i s'acaba en la seva part anterior en la proximitat de l'articulació costocondral. Més anteriorment, continua mitjançant un pla fibrós irregular, format per unes cintes conjuntives fines, la membrana intercostal externa (Rouvière 2002).

Hi ha onze parells de M. intercostals externs, amb un element a cada costat del cos. El M. intercostal extern és més gruixut que l'intercostal intern.

Està innervat pels nervis intercostals que formen part del paquet vasculonerviós intercostal, que transita entre els feixos de fibres dels MMII pel solc situat al marge inferior de la costella superior.

El M. elevador de la costella (supracostal) és posterior a l'intercostal extern. S'estén des del vèrtex d'una apòfisi transversa fins al marge superior i la cara externa de la costella de sota. L'elevador de la costella cobreix parcialment els feixos més dorsals de l'intercostal extern, amb el qual es pot arribar a confondre a aquest nivell.

Figura II.1. **Orientació esquemàtica de les fibres del M. intercostal extern.**



En la figura b) es mostra la correlació funcional de la disposició anatòmica de les fibres (explicació en el text).

Els elevadors de les costelles dels últims espais intercostals solen baixar fins a la segona costella inferior. Aquests M. s'anomenen M. elevadors llargs de les costelles.

Els elevadors de les costelles, com el seu nom indica, traccionen les costelles cap amunt, però es discuteix la seva importància funcional en la ventilació (Standing 2005).

El M. intercostal intern es situa medialment a l'intercostal extern, i només ocupa la zona de l'espai intercostal compresa entre la línia axil.lar mitja i el marge lateral de l'estèrnum. Cranialment s'insereix al solc costal de la costella superior. Les seves fibres baixen en sentit inferoposterior i acaben al marge superior de la costella subjacent. Les fibres del M. intercostal intern són pràcticament perpendiculars a les de l'intercostal extern. Com ja s'ha comentat, l'intercostal intern és un múscul més fi que l'intercostal extern. A l'igual que aquest últim, hi ha onze parells de M. intercostals interns. A la literatura anglosaxona es parla dels M. intercostals parasternals, que no són més que la continuació ventral dels M. intercostals interns quan acaba la part òssia de les costelles (*pars intercartilaginosa*). És a aquest nivell on els M. intercostals interns són més gruixuts. Recentment s'han considerat els intercostals parasternals com M. amb entitat pròpia, diferenciant-los del intercostals interns pròpiament dits (*pars intraòssia*) tant per la seva localització com per la seva funció (veure més endavant).

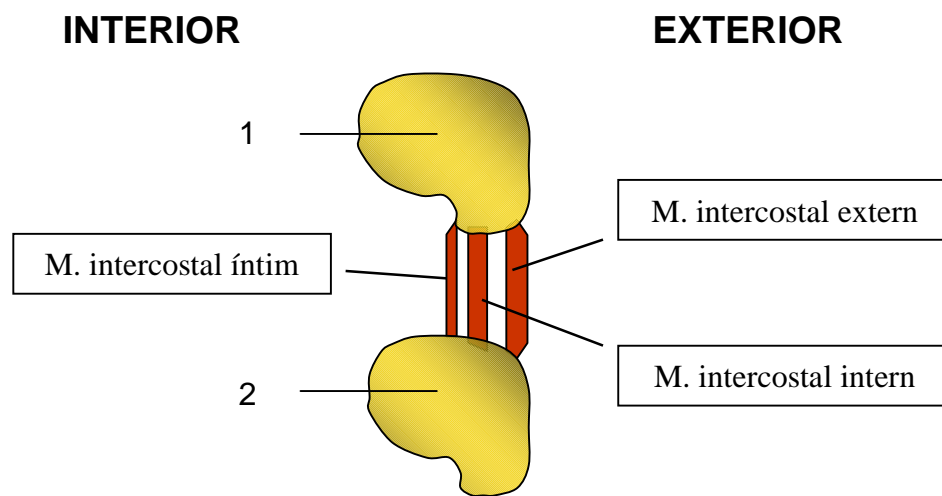
Hem de destacar que a la part ventral de l'espai intercostal només hi haurà una sola capa de fibres musculars, les del M. intercostal intern (i més concretament les dels intercostals parasternals), doncs a aquest nivell els fascicles de l'intercostal extern han desaparegut i aquest darrer M. només es troba representat per una fina aponeurosi.

El M. intercostal íntim és medial a l'intercostal intern i ocupa la regió de l'espai intercostal que s'estén des de l'angle de la costella fins arribar a 5 o 6 cm. del marge lateral de l'estèrnum. Es situa, doncs, a la part més propera a l'interior de la cavitat toràctica (Figura II.2.). L'orientació de les seves fibres és idèntica a les de l'intercostal intern, essent considerat per alguns autors com el mateix múscul però desdoblant. Els intercostals íntims es relacionen per la seva cara interna amb la fàscia endotoràctica i la pleura parietal i, per la seva cara externa, amb els vasos i nervis intercostals.

Es nomena M. subcostal (infracostal) al format pels fascicles més posteriors de l'intercostal íntim, que s'estenen des de la cara interna d'una costella a la cara interna de la costella situada per sota. A l'igual que l'intercostal íntim, es relaciona per fora amb els vasos i nervis intercostals i, per dins, amb la fàscia endotoràcica i amb la pleura parietal. Els M. subcostals provoquen el descens de les costelles.

El darrer M. que descriurem és l'únic constituent del *grup profund* de la pared anterolateral del tòrax. Tot i que, *sensu stricto*, no forma part de l'espai intercostal, la seva proximitat anatòmica i funcional justifica que sigui inclòs ací. El M. transvers del tòrax o M. triangular de l'estèrnum és un M. prim i aplanat. Està situat sobre la cara posterior del plastró esternocostal i només comprén la meitat caudal de l'estèrnum. Els seus fascicles uneixen l'estèrnum amb els cartílags costals, disposant-se de forma radiada, el que dóna al M. un aspecte dentat. La cara més interna dels intercostals parasternals es troba coberta pels feixos del triangular de l'estèrnum. Les fibres d'ambdós músculs es disposen quasi perpendiculars, éssent les del M. triangular de l'estèrnum paral·leles a les dels intercostals externs. La funció del M. transvers del tòrax és fer baixar els cartílags costals on s'insereix.

Figura II.2. **Secció transversal de dues costelles i dels M. intercostals.**



1.- Costella superior

2.- Costella inferior

De manera esquemàtica es presenten les relacions entre els tres M.intercostals situats entre dues costelles.

II.3. FUNCIO DELS MÚSCULS INTERCOSTALS.

La funció dels MMII ha estat objecte de controvèrsia. La polèmica ve marcada per la dificultat d'estudi de cada M. per separat. Molts dels coneixements que tenim sobre els MMII han estat inferits a partir de models animals, que presenten diferències evidents amb l'espècie humana, tant a nivell anatòmic com funcional (absència de bipedestació).

L'acció dels MMII ha estat, doncs, difícil de determinar amb precisió. S'ha especulat sobre les seves funcions inspiratòries i espiratòries amb conclusions certament contradictòries. Per algun autor (Delmas) reestableixen l'alçada de l'espai intercostal cada vegada que algú factor pot modificar-la. Tindrien, doncs, una acció de fixació de l'espai intercostal i, per tant, de la caixa toràtica.

Hom pensa que els M. intercostals externs actuen conjuntament amb els M. intercostals interns (Standring 2005). Tanmateix, durant la respiració, l'acció dels intercostals es coordina amb els altres músculs i estructures de la caixa toràtica i de l'abdomen. És per això que, a continuació, farem un repàs global de l'anatomia funcional dels moviments respiratoris.

II.3.1. Biomecànica de la caixa toràtica. Els ossos.

Clàssicament es considerava que la parrilla costal es comportava com una palanca de tercer grau. El seu punt de fixació seria la columna vertebral. Segons aquest model, els intercostals externs farien pujar la caixa toràtica i els interns la baixarien.

Posteriorment s'ha vist que la mecànica articular de la caixa toràtica és molt més complexa. A més, es necessita una aproximació tridimensional per a comprendre els seus moviments.

El cap de cada costella s'articula amb els cossos vertebrals de la pròpia vèrtebra i el de la superior, formant les articulacions costovertebrals. El tubercle de la costella s'articula amb l'apòfisi transversa de la vèrtebra del seu nivell, constituint l'articulació

costotransversa. Aquesta disposició anatòmica junt amb la presència de múltiples lligaments fan que els únics moviments possibles siguin petits lliscaments en direcció craneocaudal. Els desplaçaments de les costelles durant els moviments respiratoris es produeixen gràcies a la rotació del coll de la costella sobre el seu eix major.

A més, les costelles tenen forma corba i presenten una inclinació cap avall i cap endavant, de tal manera que el seu extrem ventral i els cartílags costals es troben en situació més caudal que l'extrem dorsal.

Quan les costelles es mouen en direcció cranial els seus marges anteriors es desplacen no solament cap amunt, sinò també lateral i ventralment; els cartílags costals roten cranialment a nivell de les unions condroesternals, i l'estèrnum es mou cap amunt. Això suposa un increment dels diàmetres anteroposterior i lateral de la caixa toràctica.

Per contra, quan les costelles es desplacen caudalment disminueixen els diàmetres de la caixa toràctica.

Això implica que els músculs que elevin les costelles tindran un efecte inspiratori, mentre que els que les abaixin tindran una acció espiratòria.

II.3.2. La respiració. Els músculs.

Els moviments respiratoris constitueixen un procés complex, que requereix un alt grau de coordinació entre la musculatura toràctica i l'abdominal (Standring 2005).

II.3.2.1. Els músculs respiratoris durant la inspiració.

El diafragma, com ja hem dit, és el principal múscul inspiratori, essent el responsable del 67% de la capacitat vital d'un individu. La seva funció es modifica depenent de si es tracta d'una respiració superficial o profunda. A més, hi ha importants diferències segons la postura adoptada per respirar (decúbit supí, lateral,

sedestació, ortostatisme). Així mateix, el seu funcionament ve condicionat per la distensió o no de les vísceres abdominals.

Durant la inspiració les costelles més caudals són fixades i la contracció del diafragma fa que la seva part tendinosa vagi cap avall. Això fa augmentar la pressió intraabdominal i provoca la distensió de la paret abdominal (que és elàstica). Quan la part tendinosa del diafragma és aturada per les vísceres abdominals, aquesta esdevé el punt de fixació sobre el qual les fibres diafragmàtiques continuen la seva contracció. Aquest fet provoca l'elevació de les costelles i, a més, les parts més caudals de les costelles s'obren cap a fora. Aquest moviment és més evident a les costelles inferiors (de la 7a a la 10a) i dóna lloc a un augment del diàmetre transvers del tòrax. És el que en anglès s'anomena "buckle handle" perquè recorda el moviment de la nansa d'una galleda. A nivell posterior, i gràcies a la capacitat de moviment de les articulacions costovertebrals, es facilita el desplaçament de l'extremitat ventral de les costelles i l'estèrnium cap amunt. Aquest desplaçament és més evident a les costelles superiors i és el responsable de l'augment del diàmetre anteroposterior del tòrax.

El resultat final és que durant la inspiració s'incrementen els diàmetres vertical, transversal i anteroposterior del tòrax. Fruit de la tracció de les estructures de la caixa toràctica, les pressions intrapleural i intratoràctica es fan negatives respecte a l'atmosfèrica i l'aire entra als pulmons.

En resum, la inspiració es un procés actiu en el que es produeixen:

- el descens del diafragma,
- la protrusió, més o menys manifesta, de la paret abdominal, i
- l'elevació de les costelles

Tots aquests canvis són més manifestos en la inspiració profunda. Així doncs, si l'excursió del diafragma és d'uns 1,5 cm. durant la respiració en repòs, el seu desplaçament arriba a ser de 6 a 10 cm. durant la ventilació profunda.

II.3.2.2. Els músculs respiratoris durant l'expiració.

Clàssicament s'ha considerat l'expiració com un procés passiu. Molts autors continuen defensant que l'expiració en repòs, es produeix exclusivament gràcies a la retracció elàstica de les estructures de la caixa toràcica i, sobretot, dels pulmons. En tornar a la seva posició inicial, el diafragma i els òrgans toràcics provocarien un augment de la pressió intraalveolar, que en superar a la pressió atmosfèrica faria sortir l'aire de la via aèria.

D'altra banda, és ben conegut que la musculatura abdominal és la responsable principal de l'expiració activa en els humans. Durant la respiració enèrgica, com succeeix durant l'esforç, al respirar contra càrregues o en els moviments expulsius de la tos, les forces elàstiques no tenen la força suficient per empènyer el diafragma cap amunt amb prou rapidesa, doncs l'expiració es troba molt més accelerada que en repòs. Per això actuen, principalment, els M. de la paret abdominal i els intercostals interns.

En lesionats medul.lars s'ha vist la importància dels músculs abdominals durant els moviments respiratoris, tant durant la inspiració com a l'expiració. Poc després d'una lesió cervical es produeix una paràlisi flàccida de la musculatura intercostal i abdominal. La pèrdua del to dels M. intercostals durant la inspiració fa que hi hagi un moviment paradoxal a nivell de la parrilla costal quan el diafragma es desplaça cap avall, que comporta una important reducció en la capacitat vital d'aquest malalts (Standring 2005). Durant l'expiració el diafragma es relaxa i es desplaça cap amunt. La hipotonia dels M. de l'abdomen fa que la pressió provocada pel contingut abdominal no es transmeti eficaçment cap dalt, sinò que hi hagi una distensió de la paret abdominal i una menor eficàcia en el procés espiratori. Això vindria a demostrar que l'expiració no és un procés totalment passiu, sinò que requereix un cert grau de contracció dels M. de la paret abdominal, si més no, per a mantenir el to muscular.

II.3.2.3. La musculatura de la faringe intervé en la mecànica ventilatòria.

Els M. ventilatoris segueixen actuant durant el son. S'ha comentat repetidament que el diafragma és el principal múscul inspiratori, però això és especialment cert quan dormim. Tanmateix, durant la nit, a les fases on el son és més profund, hi ha una hipotonia muscular generalitzada. Quan dormim es produeix la relaxació de la musculatura de la faringe i un augment de la resistència a la via aèria superior. Més endavant veurem com aquesta relaxació pot conduir a l'aparició periòdica d'apnees durant el son, degut al col.lapse de la via aèria. Les apnees s'acompanyen d'hipoxèmia secundària a hipoventilació. D'aquí es pot inferir que els M. de la faringe tenen un rol important en la ventilació quan estem desperts.

II.3.3. Quina és la funció primordial dels músculs intercostals?

Segons alguns autors contemporanis, el principal paper dels MMII seria el de fixar la paret toràcica, evitant el moviment paradoxal que produiria el descens del diafragma durant la inspiració (Standring 2005). Probablement la disposició quasi perpendicular de les fibres dels dos principals MMII facilitaria aquesta tasca.

Però, ja clàssicament, degut a l'orientació dels fascicles musculars dels MMII, s'havia considerat que l'intercostal extern era un múscul inspiratori i l'intercostal intern, espiratori. A més, s'ha vist que els MMII externs són més actius durant la inspiració, i els intercostals interns (que són més febles) són més actius durant l'espiració.

De Troyer ha revisat exhaustivament la funció respiratòria dels MMII (De Troyer 2005). Els intercostals fan moure les costelles, el que provoca un canvi en la configuració de la caixa toràcica.

II.3.3.1. Antecedents històrics.

Les bases dels coneixements actuals sobre els MMII es remonten al segle XVIII. Hamberger (1697-1755), en contra del que defensaven els seus contemporanis, propugnava que els intercostals externs tenien una funció inspiratòria i que els

intercostals interns eren espiratoris. La seva teoria es basava en conceptes de mecànica, estudiant l'orientació dels feixos musculars dels intercostals.

Quan els intercostals es contrauen traccionen de la costella superior cap avall i estiren de la costella inferior cap dalt. Però, com les fibres de l'intercostal extern estan inclinades en direcció caudal i ventral, la seva inserció sobre la costella inferior actua sobre l'eix de rotació de la costella provocant la seva elevació. L'efecte net dels intercostals externs seria, doncs, l'elevació de la parrilla costal i, per tant, la insuflació dels pulmons (Hamberger 1749). Per contra, les fibres de l'intercostal intern s'inclinen cap avall i endarrera, el que fa que el seu punt d'inserció a nivell de la costella inferior es trobi més a prop del centre de rotació que la seva inserció a la costella superior. La força resultant fa que els intercostals interns abaixin les costelles. Són, doncs, músculs espiratoris.

Hamberger també estudià l'acció dels intercostals parasternals. En trobar-se en posició anterior, l'acció aquests músculs s'ha de referir a l'estèrnum, i no pas a la columna vertebral. Per això, malgrat els intercostals parasternals són la continuació anatòmica dels M. intercostals interns a nivell dels cartílags costals, sense solució de continuïtat, les seves accions són antagòniques. Els intercostals parasternals aixequen les costelles i tenen una funció inspiratòria.

La teoria de Hamberger, malgrat la seva solidesa teòrica, no ha estat demostrada experimentalment.

II.3.3.2. Estudis contemporanis en humans.

Fins a dates recents els estudis dels MMII en humans eren escassos i contradictoris. Els estudis electromiogràfics (EMG) no han aportat resultats concluent. S'han estudiat els intercostals en cadàvers i, més recentment, *in vivo* utilitzant les noves tècniques d'imatge.

Però la majoria de músculs de l'espai intercostal són inacessibles *in vivo* i no poden ser activats de manera aïllada. Per això, en els darrers anys, s'han avaluat els efectes respiratoris dels MMII de manera indirecta. El mètode emprat es basa en un

teorema de la mecànica, el Teorema de Maxwell. No entrarem aquí en l'anàlisi de fórmules matemàtiques complexes. Però, podem resumir dient que el teorema de Maxwell aplicat a la caixa toràtica permet establir relacions entre la força aplicada per un múscul, la llargada i la massa del múscul, la pressió necessària per a obrir la via aèria i els canvis de volum generats. Això permet quantificar el que s'en diu l'avantatge mecànic, mitjançant una equació. L'avantatge mecànic d'un M. respiratori ens permetrà saber si té una acció inspiratòria o espiratòria.

II.3.3.3. Avantatge mecànic.

El càlcul de l'avantatge mecànic ha estat validat en models animals (De Troyer 1996) i en humans. En concret, pels MMII es va emprar la següent metodologia (Wilson 2001):

- Es van dissecar els M. de cadàvers. Es varen mesurar l'orientació de les fibres respecte a les costelles i la massa muscular dels intercostals.
- Es va practicar una tomografia computaritzada (TC) del tòrax a individus sans. Això va permetre avaluar la forma de les costelles i els canvis que es produïen durant la insuflació passiva del tòrax.
- Aplicant el *Teorema de Maxwell* es va poder calcular l'avantatge mecànic dels MMII, a partir dels canvis en la longitud de les fibres en relació a les costelles.

L'avantatge mecànic, en humans, dels M. intercostals parasternals i del triangular de l'estèrnum s'ha obtingut de manera similar (De Troyer 1998).

Segons aquest model computaritzat, els intercostals externs en la seva part dorsal i a nivell dels espais intercostals rostrals presenten un clar avantatge mecànic inspiratori. Aquest avantatge inspiratori es va perdent gradualment quan arribem a la base de la caixa toràtica i a nivell de les unions condrocostals.

Els intercostals interns presenten un avantatge mecànic espiratori, que és més marcat en la porció ventral de la caixa toràtica. A la part dorsal l'avantatge espiratori disminueix de la zona superior a la inferior.

Els intercostals parasternals presenten un avantatge mecànic inspiratori, que va decreixent en sentit caudal. En humans, aquests músculs no arriben més enllà del 5è espai intercostal.

El M. triangular de l'estèrnum té un avantatge mecànic espiratori, que és més manifest en els espais intercostals més caudals (que són el 5è i 6è per aquest múscul).

Hem de fer notar que l'acció dels MMRR en animals presenta diferències respecte a les descrites aquí.

II.3.3.4. Massa dels M. intercostals.

La contribució de cada múscul als moviments respiratoris no solament dependrà de la seva disposició espacial, sinò també de la seva massa muscular, doncs

$$\text{Força} = \text{Massa} \times \text{Acceleració}$$

Utilitzant el model experimental descrit més amunt (Wilson 2001), es va calcular la massa de cadascun dels M. de l'espai intercostal.

La massa de l'intercostal extern és més gran a la meitat dorsal dels espais intercostals superiors. Des d'allí va minvant progressivament en direcció caudal i ventral.

El M. intercostal intern quasi bé no presenta diferències en la seva massa muscular a nivell rostrocaudal. La porció ventral és lleugerament més gruixuda que la dorsal.

Els intercostals externs i interns presenten unes masses musculars molt més grans que els parasternals i el triangular de l'estèrnum.

La mitjana de la massa total dels M. intercostals externs entre els espais 1er i 8è és de 208 gr., i pels M. intercostals interns és de 138 gr. En canvi, la massa total

dels intercostals parasternals és de 32 gr. i la del triangular de l'estèrnum de 18 gr. Aquests valors podrien ajudar a comprendre quina és la contribució real de cada múscul durant els moviments respiratoris.

II.3.3.5. Sumari sobre les accions dels M. intercostals.

Malgrat es necessiten més estudis sobre la funció dels M. intercostals en repòs i durant la respiració forçada, podríem concloure que:

Els M. intercostals externs i interns actuen conjuntament. A més, la seva acció no es pot considerar per separat dels altres M. toràcics i abdominals que intervenen en els moviments respiratoris.

Els intercostals externs, considerats globalment, tindrien una funció inspiratòria, amb un gradient d'intensitat cèfalocaudal. Per la seva disposició i per la seva massa muscular els M. intercostals externs tindrien una importàcia preponderant respecte als altres M. de la paret toràcica.

Els intercostals interns, tret de la seva part intercartilaginosa (M. intercostals parasternals), tindrien una acció espiratòria.

Tant els intercostals externs com els interns actuarien fixant l'alçada de l'espai intercostal, el que facilitaria l'acció dels altres grups musculars que intervenen en la respiració.

Els MMII podrien participar en el manteniment de la postura corporal i en la rotació del tronc gràcies a la seva acció de fixació de la caixa toràcica.

II.4. ESTUDI CEL·LULAR DELS MÚSCULS INTERCOSTALS.

II.4.1. Tipus de fibres en els músculs respiratoris.

La presència de fibres lentes (tipus I) i fibres ràpides (tipus IIa i IIx) als MMRR reflecteix les seves capacitats funcionals. Així, durant una respiració reposada s'utilitzen bàsicament fibres de contracció lenta, mentre que a mesura que augmenta la freqüència respiratòria són reclutades fibres ràpides (Polla 2004). Aquest desplaçament en el reclutament de fibres lentes cap a isoformes ràpides durant la taquipnea ha estat demostrat en el diafragma i els M. parasternals dels conills. La proporció de fibres ràpides en els MMRR és superior en els petits animals de laboratori (ratolins i rates) que en humans o en els mamífers més grans, la qual cosa podria ser el reflex de la freqüència ventilatòria, que és menor en aquests darrers.

Ja hem discutit més amunt com l'acció dels intercostals i, més concretament, el seu avantatge mecànic, depèn no solament de l'orientació espacial de les fibres musculars, sinó també del número de l'espai intercostal i de la localització de les fibres dins d'un mateix espai intercostal (anterior o posterior).

L'activitat de les motoneurons juga un paper essencial en la composició de les fibres musculars. El fenotip fibril·lar depèn, entre d'altres, de la innervació de la fibra. En models animals, un increment de l'impuls nerviós cap als M. de les extremitats s'associa amb canvis en les proporcions fibril·lars, en el sentit d'una transformació de fibres ràpides cap a fibres lentes. En el ser humà s'ha descrit un augment de l'impuls nerviós cap als M. parasternals en pacients amb MPOC severa (Levine 2006).

II.4.1.1. Tipus de fibres en el M. diafragma (mecanismes d'adaptació cel·lular que expliquen dades fisiològiques).

El diafragma és el principal múscul inspiratori, i això és especialment manifest durant el son. A més, durant la respiració tranquil·la quasi tot el treball respiratori corre a càrrec del diafragma. La resta de MMRR anirà prenent protagonisme a mesura que augmentin les demandes ventilatòries.

El diafragma ha demostrat una major resistència a la fatiga que els M. de les extremitats, tant *in vitro* com *in vivo*. En l'ésser humà, els M. inspiratoris es recuperen deu vegades més depressa que alguns M. perifèrics (flexors del colze) quan fan una tasca similar (McKenzie 2006).

La composició estructural del diafragma ha de respondre, doncs, a aquestes característiques funcionals.

L'àrea d'una secció transversal de les fibres del diafragma és més petita que la dels M. perifèrics, la qual cosa redueix la distància de difusió de l'oxigen a les cèl·lules (Polla 2004). En terme mitjà, la distribució de fibres en el diafragma humà mostra un 55% de fibres de tipus I, un 21 % de IIa i un 24% de IIx (Lieberman 1973, Sánchez 1985). La distribució d'isoformes de miosina mostra que la miosina lenta suposa menys d'un 50% del total, mentre que la miosina IIa puja al voltant d'un 40%. La discrepància entre les proporcions de tipus fibril·lars i les d'isoformes de MyHC podria explicar-se pel diferent tamany del tipus de fibres i per la presència de més o menys orgànuls intracel·lulars (mitocondris).

La densitat de mitocondris, la capacitat oxidativa i el màxim consum d'oxigen del diafragma són de 2 a 6 vegades més grans que les dels M. de les extremitats.

El màxim flux sanguini (ajustat per la massa muscular) que arriba al diafragma és de 2 a 4 vegades superior que el de la major part de M. perifèrics. Tanmateix, la densitat capilar és superior. Hi ha un altre mecanisme que explica la perfusió del diafragma, fins i tot quan es contrau fortament: la pressió negativa intrapleural que provoca aquesta relativament prima làmina muscular, la qual crea un gradient de pressions que afavoreix la perfusió diafragmàtica (McKenzie 2006).

II.4.1.2. Morfometria dels M. intercostals externs.

Els MMII han estat menys estudiats que el diafragma, malgrat l'important paper que juguen en la ventilació. La seva funció mecànica i l'activació neural han estat poc conegudes fins recentment, encara que s'havia especulat sobre les seves funcions des dels temps de Galè (any 150 DC aproximadament). (McKenzie 2006).

Respecte a les dades estructurals (tamany i percentatges fibril.lars) hi ha pocs estudis i, a més a més, són força heterogenis quant al tipus d'individus estudiats.

A continuació farem una exposició en ordre cronològic dels treballs publicats sobre la morfometria dels M. intercostals externs en humans. A la Taula II.1. es mostren els percentatges de fibres de tipus I descrits en els diferents estudis. Com es pot veure, no s'inclouen els estudis més recents del nostre grup, que s'analitzen en apartats posteriors de la tesi, per no ser repetitius, doncs els percentatges fibril.lars en tots el nostres treballs són semblants a l'estudi de Gea *et al.* (Gea 1996).

Històricament, cal esmentar un primer treball (Stern 1975) on s'analitzaven mostres de M. intercostal extern obtingudes de 8 individus sans (4 homes i 4 dones). La biòpsia va ser practicada al 6è espai intercostal, a nivell de la línia axil.lar mitja. El percentatge de fibres de tipus I al M. intercostal extern va ser d'un 63% en dones i d'un 50% en homes. El tamay de les fibres va ser avaluat mesurant el seu diàmetre menor. Es va trobar que, tant les fibres de tipus I com les de tipus II, eren més grans en homes que en dones. No hi havia diferències en el diàmetre fibril.lar entre les fibres lentes i les ràpides.

Campbell *et al.* (Campbell 1980) van estudiar mostres de M. intercostal extern obtingudes en 22 pacients amb malaltia pulmonar obstructiva. El percentatge de fibres de tipus I al M. intercostal extern va ser d'un 48%.

Sánchez *et al.* (Sánchez 1982) obtingueren mostres de *latissimus dorsi*, M. intercostal intern i M. intercostal extern de 8 individus normals i 18 pacients amb neumopatia (12 presentaven una malaltia pulmonar obstructiva i 6 una malaltia restrictiva). Les biòpsies van ser realitzades al 5è espai intercostal a nivell de la línia axil.lar posterior. El percentatge de fibres de tipus I a l'intercostal extern va ser d'un 61%. No van trobar diferències en les proporcions fibril.lars entre els malalts amb neumopatia i els sans. Pel que fa al tamany (diàmetre menor), era similar en els 3 músculs estudiats per les fibres de tipus I. L'intercostal extern mostrà unes fibres de tipus II més petites que els altres dos músculs.

Un altre grup d'investigadors (Hughes 1983) van analitzar mostres de M. intercostal extern obtingudes en 43 pacients als quals es va indicar una toracotomia per sospita de neoplàsia. Aquestes van ser obtingudes a l'espai intercostal a nivell de la línia axil.lar anterior. El percentatge de fibres de tipus I va ser d'un 47%.

En un primer treball del grup de Mizuno *et al.* (Mizuno 1985) s'analitzaren mostres de 6 individus sans. Van estudiar els M. intercostals externs i interns. Es van realitzar les biòpsies a nivell de la línia axil.lar posterior. L'anàlisi histoquímica va mostrar un 59% de fibres de tipus I als intercostals externs. La proporció de fibres IIa en l'intercostal extern era inferior a les trobades en l'intercostal intern. Quant al tamany, les fibres IIa de l'intercostal extern eren més petites que les de l'intercostal intern. No hi havia diferències en les fibres de tipus I entre els dos músculs.

Amb posterioritat, el mateix grup (Mizuno 1989) va publicar un treball on s'inclogueren mostres de 8 homes joves (edat mitjana de 31 anys). Es tractava de cadàvers d'individus prèviament sans que havien mort accidentalment. Van avaluar els M. intercostals externs i interns, M. parasternals, M. diafragma i M. quàdriceps. Es van prendre mostres musculars en diferents regions de la paret toràcica i en diversos punts dins d'un mateix espai intercostal, per tal de trobar diferències degudes a la localització de les fibres a la caixa toràcica. Una de les mostres, la que es prengué a la part posterior del 5è espai intercostal, és la que agafarem com a referència, doncs és on nosaltres hem biopsiat els nostres pacients (veure mètodes). El percentatge de fibres de tipus I a aquest nivell fou del 62 ± 3 %. Malgrat tot, no es van trobar diferències quant als percentatges fibril.lars entre les diferents mostres dels músculs intercostals, tret de les obtingudes al 8è espai. El diafragma i el quàdriceps presentaven un tant per cent de fibres lentes força inferior als intercostals. Pel que fa a les fibres de tipus II, novament els M. intercostals interns tenien una proporció de fibres IIa superior als intercostals externs. Pel que fa al tamany de les cè.lules musculars, l'intercostal intern tenia unes fibres més grans que l'intercostal extern. Aquesta diferència era deguda tant al major tamany de les fibres I com al de les tipus IIa. Respecte als altres músculs estudiats, val a dir que les fibres de l'intercostal extern eren més petites que les del quàdriceps.

Taula II.1.

Percentatge de fibres de tipus I en el M. intercostal extern humà.

	<i>Nombre de pacients</i> (n)	<i>Tipus de pacients</i>	<i>% de fibres tipus I</i> (mitjana)
Sauleda 1998	27	Neoplàsia	62
Gea 1996	52	MPOC i sans	55
Hards 1990	49	Sospita neoplàsia	64
Mizuno 1989	8	Cadàver	62
Mizuno 1985	6	Sans	59
Hughes 1983	43	Sospita neoplàsia	47
Sánchez 1982	26	Pneumopatia i sans	61
Campbell 1980	22	MPOC	48
Stern 1975	4	Sans	50 (homes)
	4		63 (dones)

NOTA: Els estudis més antics no informen de la desviació estàndard, motiu pel qual les dades de la taula s'expressen solament com a mitjana.

Hards *et al.* (Hards 1990) van analitzar mostres de *latissimus dorsi*, M. intercostal intern i M. intercostal extern obtingudes de 68 pacients als que es va indicar una toracotomia per presentar un nòdul o massa pulmonar. Finalment només van ser vàlides 49 biòpsies d'intercostal extern. Hi havia homes (31) i dones (18). Les biòpsies van ser obtingudes al 6è espai intercostal a nivell de la línia axil.lar posterior. Els malalts presentaven un FEV₁ del 83 ± 19 % pred. (hi havia MPOCs). El percentatge de fibres de tipus I va ser d'un 64 ± 9 % a l'intercostal extern. Van descriure una proporció de fibres de tipus I superior als M. intercostals que al *latissimus dorsi*. El tamany de les fibres era expressat com a diàmetre menor, i era més gran en homes que en dones. El diàmetre de les fibres de tipus II era menor a l'intercostal extern que als altres dos músculs. Els autors trobaren una relació entre el tant per cent del BMI ideal i el tamany de les cèl.lules musculars.

El nostre grup (Gea 1996) estudià la morfometria del M. intercostal extern en un treball que va incloure 52 homes. Les mostres foren obtingudes mitjançant biòpsia a la línia axil.lar posterior. Onze individus tenien una funció pulmonar normal i 41 patien MPOC (19 severos o molt severos). Els subjectes estudiats presentaven un FEV₁ del 60 ± 21% pred. Les tècniques emprades per a la identificació de fibres van ser l'ATPasa i l'electroforesi en condicions de desnaturalització i la densitometria làser per la quantificació de les isoformes de miosina. El percentatge de fibres de tipus I va ser d'un 55 ± 10%. El percentatge de fibres de tipus II era proporcional al grau d'obstrucció de la via aèria. Els malalts amb MPOC severa presentaven una proporció de fibres de tipus II clarament superior als individus sans (49 ± 8 vs 35 ± 8%, p<0,005). Resultats similars mostraven les isoformes de miosina.

En un estudi posterior (Sauleda 1998), vam analitzar mostres de diafragma i M. intercostal extern obtingudes mitjançant toracotomia i biòpsia al 5è espai intercostal a nivell de la línia axil.lar posterior, en 27 pacients amb càncer de pulmó localitzat. Els malalts presentaven una obstrucció lleu al flux aeri (FEV₁ del 70 ± 14% pred) (hi havia pacients amb MPOC). Les tècniques histoquímiques emprades per a la identificació de fibres van ser l'ATPasa i la tinció amb nicotinamida adenina dinucleòtid tetrazoli reductasa (NADH-TR). El percentatge de fibres de tipus I va ser d'un 56 ± 9% al diafragma i d'un 62 ± 10% als intercostals externs. Quant al tamany fibril.lar vàrem trobar unes àrees més grans en els intercostals que estudis previs. El tamany de les fibres de l'intercostal (i diafragma) estava relacionat amb la pressió inspiratòria màxima

(PIM % pred). No es va trobar cap relació entre els paràmetres de funció respiratòria i la morfometria dels dos músculs estudiats.

Més recentment (Levine 2006), s'han estudiat els tipus fibril.lars i les proporcions de MyHC en uns altres músculs inspiratoris de la caixa toràcica, els M. intercostals parasternals (MP). Es van incloure 7 malalts amb MPOC severa programats per a cirurgia de reducció de volum pulmonar, i 7 controls als qui es va practicar toracotomia per a l'extracció d'un nòdul pulmonar solitari. La biòpsia del MP es portà a terme a nivell del 3er espai intercostal, a un centímetre del marge lateral de l'estèrnium. Per identificar els tipus de fibres es practicà immunohistoquímica de totes les mostres, i les proporcions de MyHC es van determinar mitjançant SDS-PAGE seguit de densitometria. El FEV₁ del pacients amb MPOC era del 29 ± 2 % pred. Els autors van trobar que els MP dels malalts amb MPOC tenien més fibres lentes que els controls (73 ± 4 vs 51 ± 3 %, $p < 0,01$) i mostraven una proporció més gran de les isoformes lentes de MyHC.

Val a dir que tots els treballs citats que han estudiat els M. intercostals externs, van fer servir la tinció histoquímica de l'adenosina trifosfatasa miofibril.lar (ATPasa) per tal d'identificar els diferents tipus de fibres. En cap estudi es fa menció de les fibres híbrides.

Malgrat les limitacions metodològiques evidents, derivades de la heterogeneïtat dels estudis, i sense cap pretensió de treure conclusions que només estudis ben dissenyats podrien suggerir, podríem resumir les dades (històriques) sobre la morfometria dels M. intercostals externs com segueix:

a) Població analitzada.

a.1) Sexe. Tal i com s'ha descrit en els M. perifèrics, el tamany de les fibres dels intercostals sembla ser més gran en homes que en dones. Stern *et al.* troben un percentatge superior de fibres de tipus I en dones.

a.2) Estat nutricional. La majoria d'estudis no troben relació entre els paràmetres nutricionals i la morfometria dels MMII. Això no obstant, el grup de

Hards *et al.* descriu una relació entre el % del BMI ideal i el tamany de les fibres de l'intercostal extern.

a.3) Funció pulmonar. Malgrat algun estudi no troba diferències entre sans i malalts amb pneumopatia crònica obstructiva, el nostre grup ha descrit que la proporció de fibres de tipus II del M. intercostal extern és major en el subgrup de pacients amb MPOC severa.

b) Lloc de la biòpsia. L'estudi de Mizuno (1989) no troba diferències entre diferents biòpsies realitzades al mateix espai intercostal (5è espai intercostal), però sí que n'hi ha quan la mostra s'obté al 8è espai del mateix costat. L'obtenció de mostres musculars es va fer en una localització similar a l'efectuada pel nostre grup en els estudis de Mizuno, Sánchez, Hards i Stern.

c) Fenotip fibril·lar. Les fibres predominants en el M. intercostal extern són les fibres lentes (més d'un 50% a la majoria d'estudis). Els estudis mostren que l'intercostal extern presenta més fibres de tipus I que els M. perifèrics. També suggereixen que hi ha un tant per cent de fibres I més elevat a l'intercostal extern que al diafragma. Quant a les fibres ràpides hi ha treballs que indiquen que la proporció de fibres IIa és inferior a l'intercostal extern que a l'intern.

d) Tamany de les fibres. En general, les cèl·lules musculars del M. intercostal extern són més petites que les fibres dels M. de les extremitats. Un tamany encara menor podria correspondre al diafragma si bé les diferències amb els intercostals externs són escasses (Mizuno 1991).

d.1) Tamany de les fibres de tipus I. El tamany de les fibres lentes de l'intercostal extern va ser similar al de l'intercostal intern i al *latissimus dorsi* (múscul control). El nostre grup va trobar una relació entre el tamany de les fibres de l'intercostal extern i la força dels M. respiratoris (PIM).

d.2) Tamany de les fibres de tipus II. Pel que fa a les fibres de contracció ràpida, l'intercostal extern les té més petites que l'intercostal intern i el dorsal ample. No obstant això, sembla ser que les fibres de tipus II de l'intercostal extern són més grosses que les tipus I.

Les limitacions d'aquest sumari són evidents, i venen donades per múltiples factors, com són les diferències en la població estudiada quant a l'edat, el sexe, la presència o no de malaltia (MPOC, neoplàsia), el lloc on es realitzaven les biòpsies, i si les mostres s'obtenien d'individus vius o de cadàver. Tanmateix, hi ha estudis que inclouen un nombre molt baix d'individus. L'única finalitat per la que aquestes dades són exposades aquí és pel seu interès històric, el que ens ha permès fer un repàs cronològic dels primers estudis realitzats sobre la morfometria dels MMII.

Les relativament poques dades de qualitat que avui dia disposem sobre els MMII confirmen la necessitat d'estudis prospectius, amb un disseny acurat, que avaluïn tant la morfometria com la immunohistoquímica i la funció dels M. Intercostals externs, així com les possibles modificacions provocades per les intervencions terapèutiques en l'estructura i la funció d'aquests músculs.

III. INFLAMACIÓ.

III.1. INTRODUCCIÓ.

III.1.1. Concepte.

En general, s'entén per *inflamació* a la resposta tissular provocada per agents físics (per exemple, traumatismes o radiació) o per patògens (virus, bacteris, fongs, etc...), caracteritzada per un increment en el flux de sang cap a l'àrea afectada, un augment de la permeabilitat capil·lar que permet la sortida de grans molècules del llit vascular, i la migració de leucòcits cap els teixits del voltant. S'assumeix que la inflamació és una resposta al dany tissular (Male 2006).

Esquemàticament, podem resumir dient que la inflamació és una reacció complexa del sistema immunitari que cursa amb:

- Modificacions en els vasos sanguinis
- Acúmulo de líquid i proteïnes plasmàtiques
- Acumulació i activació de leucòcits

Com acabem de comentar, aquesta reacció inflamatòria és desencadenada per agents lesius, com poden ser els microbis i les cèl·lules lesionades, i no es tracta únicament d'un fenomen local sinó que hi ha una reacció sistèmica (Kumar 2005).

A mesura que hem anat coneixent millor la complexitat de la resposta inflamatòria i les seves bases moleculars, aquesta definició clàssica de la inflamació s'ha anat revisant. En els darrers anys diferents autors han utilitzat el terme anglès "low grade inflammation", es a dir, inflamació de baixa intensitat, per a descriure tota una sèrie de canvis que es produeixen en les fases inicials del procés inflamatori i que venen vehiculats per l'aparició de citocines, quimiocines, molècules d'adhesió i altres proteïnes que s'han descobert recentment. En aquestes fases inicials de la inflamació no hi hauria el clàssic infiltrat de cèl·lules inflamatòries ni la marcada vasodilatació i edema pròpies de lesions més agudes. Més encara, si bé la font principal de les molècules implicades en la inflamació serien les cèl·lules del sistema immune, en especial els macròfags, en els darrers anys s'ha descobert que moltes cèl·lules presents

en diferents teixits tenen la capacitat de secretar mediadors de la inflamació. Entre d'altres, els adipòcits secreten adipocines i les fibres musculars miocines, que són proteïnes que participen en els processos de senyalització intercel.lular i en la resposta immune.

III.1.2. Tipus d'inflamació.

Clàssicament s'ha dividit la inflamació en dos patrons molt ben definits: *inflamació aguda* i *inflamació crònica*.

La inflamació aguda té un començament ràpid (de segons a minuts) i una durada relativament curta (d'uns minuts a uns pocs dies). Les seves principals característiques són l'exsudació de líquid i de proteïnes plasmàtiques (edema), i la migració de leucòcits, predominantment neutròfils (Kumar 2005).

La inflamació crònica és de més llarga durada (setmanes i mesos) i histològicament es caracteritza per la presència de limfòcits i macròfags, la proliferació de vasos sanguinis, la fibrosi i la necrosi tissular.

Ambdós tipus d'inflamació presenten una resposta vascular i cel.lular, que estan mediades per factors químics que més endavant descriurem.

Com s'ha comentat més amunt, potser podríem afegir un tercer tipus de reacció inflamatòria, la inflamació de baixa intensitat, en la que els protagonistes serien els mediadors químics de la inflamació, i on la presència de cèl.lules inflamatòries seria escassa i el component vascular inapreciable. En alguns casos aquesta darrera resposta inflamatòria precediria a les dues anteriors.

III.2. RESPOSTA CEL·LULAR A LA INFLAMACIÓ.

Una funció crítica de la inflamació és la d'atreure leucòcits fins el lloc de la lesió i activar-los per tal que executin la seva funció de defensa de l'hoste (Kumar 2005). La resposta cel·lular immune quan hi ha dany tissular o infecció necessita del reclutament de leucòcits de la sang (Auffray 2007).

El viatge dels leucòcits des de la llum del vas sanguini fins a l'espai intersticial s'anomena *extravasació*. Durant el procés de migració, els leucòcits en primer lloc roden sobre si mateixos, després s'activen i s'adhereixen a l'endoteli. A continuació transmigren a través de l'endoteli, perforen la membrana basal i es mouen cap el lloc de la lesió gràcies a les substàncies quimioattractives. Diferents molècules intervenen en cada pas d'aquest procés (Kumar 2005):

- *Selectines*, en el rodament
- *Quimiocines*, en l'activació dels neutròfils
- *Integrines*, en l'adhesió
- *PECAM-1*, en la transmigració

Tots els leucòcits (neutròfils, eosinòfils, basòfils, monòcits i limfòcits) utilitzen aquesta mateixa via per passar de la sang als teixits.

Inicialment, després d'una lesió o infecció aguda, els neutròfils són reclutats ràpidament des de l'aparell circulatori fins el lloc de la lesió. Més tard, cèl·lules del tipus monòcit/macròfag reemplacen els neutròfils en el punt inflamatori. Tant els neutròfils com els macròfags migren des de la circulació fins els teixits a través de l'endoteli. Sembla ser que les cèl·lules endotelials alliberen factors solubles, com les quimiocines, que tenen un efecte quimiotàctic, és a dir, que promouen la locomoció de les cèl·lules seguint un gradient químic. El paper crític de les quimiocines en el reclutament de cèl·lules mieloides està ben documentat en models animals (Charo 2006).

Però, darrerament han aparegut nous estudis que demostren, en rates, que els monòcits són capaços de respondre a senyals emeses per cèl·lules endògenes del propi focus inflamatori independentment del reclutament dels neutròfils (Henderson 2003).

Dit d'una altra manera, en certes situacions, els monòcits circulants apareixerien ràpidament en el lloc inflammat, simultàniament amb els neutròfils.

III.2.1. Origen de les cèl.lules sanguínies.

Totes les cèl.lules de la sang de les línies eritroide, mieloide i limfoide deriven de les *cèl.lules mare hematopoètiques* o *hematopoietic stem cells* (HSC) que resideixen al moll de l'os. En un primer estadi aquestes HSC són pluripotencials i poden donar lloc a totes les cèl.lules sanguínies. A mesura que van madurant les *stem cells* assoleixen una major especificitat. Aleshores apareixen:

- El progenitor de megacariòcits i de la sèrie eritroide (MEP)
- El progenitor comú limfoide (CLP)
- El progenitor comú mieloide (CMP)

Del MEP derivaran els eritròcits i les plaquetes. El CLP donarà lloc als limfòcits, però no als macròfags ni als granulòcits. El CMP és la cèl.lula precursora dels monòcits/macròfags i dels granulòcits (neutròfils, eosinòfils i basòfils).

III.2.2. Neutròfils.

Com ja s'ha apuntat més amunt els neutròfils són leucòcits que pertanyen als *granulòcits* o *leucòcits polimorfonuclears*, en contraposició als leucòcits mononuclears que presenten un únic nucli no lobulat. Quan es parla de cèl.lules mononuclears en sang es fa referència als limfòcits i als monòcits. Avui dia se sap que els granulòcits també tenen un nucli únic però aquest és multilobulat. Tots els granulòcits deuen el seu nom a la presència molt abundant de grànuls al seu citoplasma. Segons la composició d'aquests grànuls observarem diferències en la tinció, podent-se diferenciar els neutròfils dels basòfils i dels eosinòfils. Els neutròfils són els granulòcits més petits, amb un diàmetre promig de 10 a 14 μm (Young 2001).

Els neutròfils representen del 55 al 70% de les cèl.lules circulants de la sèrie blanca. La seva vida mitjana a la sang és de 12 a 20 hores. Són els primers leucòcits en arribar als teixits lesionats. La seva activitat a la zona inflamada seria màxima durant les primeres 3 a 24 hores, però poden romandre en número elevat fins a una setmana. En casos excepcionals d'inflamació crònica, l'infiltrat per neutròfils ha perdurat durant mesos (osteomielitis).

Però, apart de la seva implicació predominant en la inflamació aguda, s'ha suggerit que la funció dels neutròfils seria necessària per a la reparació tissular (Butterfield 2006). Els neutròfils són necessaris per fagocitar precoçment les restes cel.lulars i necròtiques del teixit inflamat. A més, secreten citocines amb propietats quimiotàctiques pels macròfags. I és ben sabut que ambdós tipus cel.lulars són els especialitzats en fagocitar microbis i altres substàncies. Això possibilitaria una òptima reparació estructural i funcional de la zona lesionada.

Malgrat tot, no es coneixen bé els mecanismes últims que condicionen l'activitat dels neutròfils. S'ha vist que la persistència de l'infiltrat per neutròfils manté actiu el procés inflamatori i s'associa a una pitjor regeneració tissular.

III.2.3. Limfòcits.

El coneixement de les diferents subpoblacions de limfòcits i els mediadors que produeixen ha suposat, en els darrers anys, un dels avenços més importants en l'estudi de la resposta immune i inflamatòria. Han passat de ser els "leucòcits més petits" en sang perifèrica, a ser considerats les principals cèl.lules responsables del desenvolupament, la regulació i l'execució de la resposta immunitària. Una revisió exhaustiva del sistema immune queda fora de l'àmbit del present treball. Ens limitarem a comentar alguns aspectes que poden fer més entenedors els resultats de la nostra investigació.

Històricament, els limfòcits s'han inclòs dins de les cèl.lules mononuclears, juntament amb les cèl.lules plasmàtiques i els macròfags. Són les cèl.lules més petites de la sèrie blanca, amb un diàmetre de 6 a 9 μm , només una mica més gran que els hematies, que fan 7 o 8 μm . Al microscopi es veuen com cèl.lules rodones amb un

gran nucli central i un citoplasma molt escàs. Hi ha un subgrup de limfòcits que són més grans (9-15 µm), que es troben en poca quantitat en sang perifèrica, i que tenen més citoplasma que els limfòcits habituals. Solen ser limfòcits B activats o cèl.lules NK (veure més endavant).

Els limfòcits suposen d'un 25 a un 45% de la fòrmula leucocitària.

Tots els limfòcits provenen d'una cèl.lula precursora del moll de l'os, el progenitor comú limfoide (CLP).

Hi ha dos tipus d'*immunitat adquirida* o *específica*:

- la immunitat mediada per cèl.lules o immunitat cel.lular, que és la responsable de la defensa contra microbis intracel.lulars, i
- la immunitat humoral, que ens protegeix contra els microbis extracel.lulars i les seves toxines.

La immunitat cel.lular està mediada per *limfòcits T* o *cèl.lules T*, que procedeixen del timus. La immunitat humoral està mediada per *limfòcits B* que provenen del moll de l'os, i pels productes que secreten, els *anticossos*.

Però, apart dels limfòcits B i T, entre els limfòcits perifèrics en sang hi ha un tercer tipus, les *cèl.lules citolítiques naturals* o *natural killer* (cèl.lules NK). Les cèl.lules NK suposen d'un 10 al 15% dels limfòcits circulants. Són de tamany més gran que els altres limfòcits i presenten grànuls azuròfils, per això s'en deien "limfòcits grans granulars".

Una vegada han tingut contacte amb un antigen específic, tant les cèl.lules T com les cèl.lules B, poden convertir-se en cèl.lules efectores, amb capacitat de lisar microbis o altres cèl.lules per si mateixes (limfòcits T citotòxics) o mitjançant els seus productes (anticossos), o en cèl.lules amb memòria immunològica, que poden romandre durant anys a l'organisme. Aquestes darreres patiran una proliferació clonal quan reconeixin novament l'antigen específic.

Els limfòcits estimulats per un antigen també poden ser mobilitzats cap el focus inflamatori. Gràcies a diverses molècules d'adhesió i quimiocines migren cap el lloc on es troba la inflamació i poden constituir un infiltrat per limfòcits. Les citocines secretades pels macròfags activats, principalment el factor de necrosi tumoral alfa (TNF) i la interleucina 1 (IL-1), afavoreixen el reclutament de limfòcits.

III.2.3.1. Limfòcits T.

Les cèl.lules T madures *verges* (que no han tingut contacte amb cap antigen) es troben a la sang, on constitueixen un 60 o un 70% de tots els limfòcits circulants. També trobem cèl.lules T a les zones T dels òrgans limfoides perifèrics, com la melsa i els ganglis limfàtics. Totes les cèl.lules T provenen de precursors immunitaris del timus.

Cada cèl.lula T està programada genèticament per a reconèixer un antigen específic lligat a la cèl.lula mitjançant un receptor de cèl.lula T (TCR) específic. El TCR és una molècula complexa situada a la membrana cel.lular i formada per un heterodímer de dues cadenes peptídiques ($\alpha\beta$ en el cas del TCR-2 i $\gamma\delta$ en el TCR-1) associades al complex CD3 que, alhora, està format per 5 cadenes peptídiques. El CD3 s'utilitza com a marcador de cèl.lules T.

Els limfòcits T no poden ser activats per antigens solubles. Per tant, necessiten la presentació d'antgens processats, lligats a la membrana de les cèl.lules presentadores d'antigen (CPA). El TCR reconeix els pèptids dels antigens que estan exposats mitjançant les molècules del complex major d'histocompatibilitat (MHC) que es troben a la superfície de les CPA.

Apart del complex CD3, les cèl.lules T expressen un gran nombre de molècules de superfície a la seva membrana, entre les que destaquen CD8, CD4, CD2, integrines i CD28. El CD4 i el CD8 s'expressen en dos subpoblacions mutuament exclusives de cèl.lules T. Són glucoproteïnes associades a la membrana de les cèl.lules T que serveixen com coreceptors en l'activació d'aquests limfòcits T. CD8 s'expressa en un 30% de les cèl.lules T. Les cèl.lules CD4+ s'anomenen *cèl.lules T col.laboradores* (*T helper*) i només poden reconèixer i respondre a l'antigen en contacte amb les

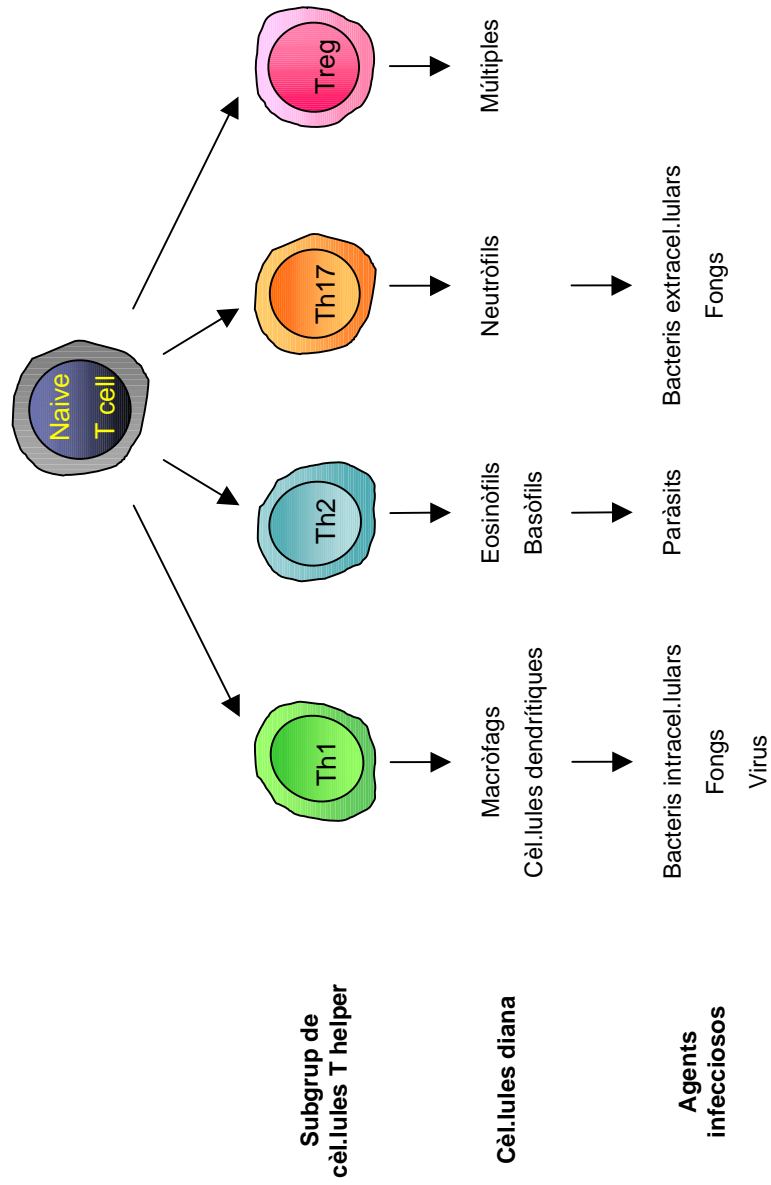
molècules MHC de classe II. Les molècules MHC de classe II estan restringides, en gran part, a les CPA (cèl.lules dendrítiques, macròfags i cèl.lules B). Les cèl.lules CD8+ s'anomenen *cèl.lules T citotòxiques* i només poden reconèixer i respondre a l'antigen en associació a les molècules MHC de classe I. Les molècules MHC de classe I s'expressen en totes les cèl.lules nucleades de l'organisme i a les plaquetes.

La cèl.lula T CD4+ es pot considerar el regulador principal de la resposta immunitària. En secretar citocines les cèl.lules T CD4+ influeixen en la funció de pràcticament totes les altres cèl.lules del sistema immune: altres cèl.lules T, cèl.lules B, macròfags i cèl.lules *natural killer* ó NK. El paper central de les cèl.lules T CD4+ queda demostrat a l'estudiar el virus de la immunodeficiència humana (VIH) que, destruint selectivament aquest subgrup de cèl.lules, acaba mutilant tot el sistema immune.

En els darrers anys s'han identificat dues poblacions funcionalment diferents de cèl.lules T CD4+, en base a les diferents citocines que secreten: les cèl.lules Th1 i Th2. El subgrup de cèl.lules T col.laboradores Th1 produeix IL-2 i interferon gamma (IFN- γ), mentre que les cèl.lules Th2 sintetitzen IL-2, IL-4, IL-5 i IL-13, però no IFN- γ . El subgrup Th1 està implicat en accions facilitades per l'IFN- γ , com són la hipersensibilitat retardada, l'activació de macròfags, i la síntesi d'anticossos d'opsonització i fixació del complement. Participen en l'eliminació de certs patògens intracel.lulars. El subgrup Th2 ajuda a la síntesi d'altres anticossos, sobretot la immunoglobulina E (Ig E), i participa en l'activació dels eosinòfils (mediada per IL-5). S'han vinculat amb l'erradicació de paràsits. Més recentment, s'han descobert 2 subtipus addicionals de cèl.lules T CD4+: les cèl.lules T reguladores (Treg) i les que secreten IL-17 (Th17). Podríem resumir dient que les cèl.lules T CD4+ *verges* (en anglès "naives") presenten una notable plasticitat, i poden desenvolupar-se en 4 línies cel.lulars diferents: les cèl.lules Th1, Th2 i Th17, que són efectores, i les Treg que són reguladores (Weaver 2006, Schmidt-Weber 2007). Junt amb l'estimulació antigènica, diverses citocines juguen un paper fonamental en la diferenciació cap a una línia cel.lular específica (Figura III.1.).

Les cèl.lules T CD8+ funcionen fonamentalment com a cèl.lules citotòxiques que destrueixen altres cèl.lules però, de manera similar a les cèl.lules T CD4+, poden secretar citocines, principalment del tipus Th1.

Subtipus de cèl·lules T col·laboradores (*helper*).



En un ambient local adequat i sota l' estímul de diferents citocines una cèl·lula T verge (*naive*) es converteix en un dels 4 subtipus de cèl·lules T *helper*. Així mateix, cada subtipus cel·lular produirà citocines, que presenten una certa especificitat. (Modificat de Schmidt-Weber 2007).

III.2.3.2. Limfòcits B.

Els limfòcits B, en els éssers humans, es desenvolupen a partir de precursors al moll de l'os, que és l'equivalent a la "Bursa de Fabrizio" de les aus, i que és la que els hi dona el nom ("B"). Les cèl.lules B madures constitueixen entre un 10 i un 20% de tots els limfòcits circulants perifèrics. També trobem cèl.lules B als ganglis limfàtics, a la melsa, a les amígdals i al tracte gastrointestinal (*teixit limfoide associat a mucoses* o MALT). Típicament les cèl.lules B s'agreguen formant els fol·licles limfoides als ganglis limfàtics i a la melsa.

Les cèl.lules B reconeixen l'antigen a través del complex receptor antigènic de cèl.lula B (BCR). La immunoglobulina M (IgM) i la IgD estan presents a la superfície de totes les cèl.lules B verges, i constitueixen el component fixador del BCR. Apart de les immunoglobulines de membrana el BCR conté un heterodímer de proteïnes transmembrana Iga i Igβ (Kumar 2005). A l'igual que passa amb les cèl.lules T, cada receptor de cèl.lula B té una única especificitat d'antigen, derivada en part dels reordenaments somàtics dels gens de les immunoglobulines. Els limfòcits B poden ser activats per antigens solubles, tan de composició proteica com no proteica.

Després de ser estimulades per un antigen les cèl.lules B activades es diferencien en cèl.lules plasmàtiques, que secreten *immunoglobulines* o *anticossos*, que són els mediadors de la immunitat humoral. Les immunoglobulines són glucoproteïnes que pertanyen a la superfamília de les immunoglobulines, i constitueixen la forma soluble del BCR. Els anticossos secretats tenen la capacitat de trobar, neutralitzar i eliminar antigens. La resposta de les cèl.lules B en front d'antigens proteics necessita de l'ajut de les cèl.lules T CD4+. Les cèl.lules T col·laboradores activen a les cèl.lules B mitjançant el CD40, que és un membre de la família del receptor del TNF. Diferents citocines estimulen les cèl.lules B perquè produeixin els anticossos.

Les cèl.lules B també expressen altres molècules que són essencials per a la seva funció: receptors del complement, receptors de Fc i CD40.

III.2.4. Cèl.lules NK.

Les cèl.lules NK no presenten receptors cel.lulars T ni immunoglobulines a la superfície de la seva membrana plasmàtica. Poseeixen dues molècules de superfície que serveixen per a la seva identificació: CD16 i CD56. Sense cap tipus de sensibilització prèvia tenen la capacitat innata de destruir diferents tipus de cèl.lules: tumorals, infectades per virus i, fins i tot, cèl.lules normals. Així, doncs, formen part de la resposta immune innata (no adquirida o específica) i poden ser la primera línia de defensa en front de les infeccions víriques i alguns tumors.

L'activitat de les cèl.lules NK vindria regulada per receptors inhibidors i receptors activadors. Els receptors inhibidors reconeixen les molècules del MHC de classe I. Hom pensa que les cèl.lules NK estan inhibides per causar la citòlisi de les cèl.lules normals perquè totes les cèl.lules normals nucleades expressen molècules pròpies del MHC de classe I.

Les cèl.lules NK segreguen citocines com el IFN- γ , el TNF i el factor estimulador de colònies de granulòcits i macròfags (GM-CSF). El IFN- γ activa els macròfags per a destruir microbis ingerits. D'aquesta manera les cèl.lules NK suposen una defensa inicial contra les infeccions microbianes intracel.lulars. Tanmateix, el IFN- γ també promou la diferenciació de les cèl.lules T CD4+ verges en cèl.lules Th1. L'activació de les cèl.lules NK està regulada per moltes citocines, entre les que destaquen IL-2, IL-12 i IL-15.

III.2.5. Monòcits i macròfags.

Els monòcits circulants provenen del moll de l'os i tenen una vida mitjana d'uns 3 dies. Els monòcits són els leucòcits més grans que hi ha a la sang, amb un diàmetre promig de 15 a 20 μm . Tenen un nucli únic i gran amb una fenedura que li dóna un aspecte de ronyò. Els monòcits suposen d'un 5 a un 10 % de tots els leucòcits circulants en sang. Un cop abandonen els vasos sanguinis, els monòcits es transformen en macròfags, que són cèl.lules fagocítiques més grans. Els histiòcits són macròfags que romanen als teixits.

El macròfag és la cèl.lula dominant en la inflamació crònica. En la inflamació aguda els monòcits comencen a migrar cap els teixits extravasculars ben aviat. Tan és així, que poden constituir-se en el tipus cel.lular predominant a les 48 hores d'iniciada la lesió. Els macròfags juguen un paper fonamental en la inflamació. Els macròfags activats són la principal font de *citocines* que intervenen en la reacció inflamatòria, encara que d'altres leucòcits també hi contribueixen (Kumar 2005). Les citocines amplifiquen i regulen la *resposta inflamatòria*. Són substàncies que controlen punts crítics, tant en l'inici i la resolució del procés inflamatori, com en la *reparació tissular*.

El *sistema mononuclear fagocític* (SMF), abans nomenat sistema reticle-endotelial, està constituït per cèl.lules que provenen dels monòcits sanguinis i que assolixen un alt grau d'especialització en diferents teixits. No se sap encara si totes les cèl.lules del SMF provenen directament dels monòcits madurs circulants o bé d'una cèl.lula precursora comú (Gordon 2005). Inicialment es considerava que pertanyien al SMF les cèl.lules de Kupffer del fetge, les cèl.lules de Langerhans de la pell, els osteoclastes de l'os i les cèl.lules de la microglia del sistema nerviós central. Avui dia també s'inclouen els macròfags alveolars del pulmó; els del timus i la melsa; els presents a la làmina pròpia dels budells; els macròfags presents a les seroses; i les cèl.lules dendrítiques, que es troben als ganglis limfàtics entre moltes altres localitzacions. Recentment s'han descrit poblacions de macròfags "residents" en teixits com el múscul i el teixit adipós, sense un desencadenant inflamatori que justifiqui la seva presència.

III.2.5.1. Funcions dels monòcits/macròfags.

Primerament es pensava que els macròfags només tenien una funció fagocítica i bactericida. Posteriorment s'ha vist que tenen un rol important com a cèl.lules presentadores d'antigen (CPA). A més, participen en els processos de senyalització intercel.lular secretant substàncies com les citocines.

Els macròfags són unes cèl.lules amb una gran plasticitat que segons el seu grau d'activació poden exercir múltiples funcions, fins i tot oposades. Poden ser cèl.lules efectores capaces de provocar lesió cel.lular o bé participar en els processos de reparació tissular. Així, doncs, els macròfags tissulars tenen un rol fonamental en el

manteniment de l'homeostasi. A través del *clearance* de cèl.lules mortes i restes necròtics, contribueixen al remodelatge i reparació dels teixits després d'una agressió inflamatòria (Gordon 2005).

Podem resumir les accions dels macròfags sobre el sistema immune com segueix:

1. Indueixen respostes immunitàries mediades per cèl.lules. Una vegada han fagocitat microbis i antigens proteics, presenten els fragments peptídics a les cèl.lules T.
2. Els macròfags són cèl.lules efectores en certes formes d'immunitat cel.lular, com les reaccions d'hipersensibilitat retardada. Els macròfags serien activats per citocines, principalment IFN- γ , que és secretat per les cèl.lules T col.laboradores del subgrup Th1.
3. Actuen en la fase efectora de la immunitat humoral. Són cèl.lules que fagociten microbis que estan opsonitzats (recoberts) per IgG o el component C3b del sistema del complement.

Hi ha dos subtipus principals de monòcits en els mamífers (Auffray 2007). Tots dos tenen una cèl.lula hematopoètica precursora comú, el *monoblast* o precursor de macròfags i cèl.lules dendrítiques.

Els anomenats monòcits "inflamatoris" expressen la proteïna de superfície Ly6c (Gr1⁺), el receptor de quimiocines CCR2 i la molècula d'adhesió L-selectina. Aquest tipus de monòcits són reclutats selectivament cap als teixits inflamats i als ganglis limfàtics. Són capaços de diferenciar-se cap a cèl.lules dendrítiques inflamatòries i poden tornar a omplir els compartiments de cèl.lules residents de la pell, el tracte digestiu i els pulmons.

Els monòcits "residents" han estat descrits en ratolins, i es diuen així perquè han estat trobats tant en teixits inflamats com en repòs. Les seves funcions encara no són ben conegudes. Es caracteritzen per tenir un menor tamany i perquè expressen el receptor de quimiocines CX₃CR1 i la integrina LFA-1. No expressen la proteïna Ly6c (Gr1⁺), ni el CCR2, ni la L-selectina.

En humans també s'han identificat dos subtipus de monòcits equiparables als monòcits inflamatoris i residents dels ratolins. El fet que els dos subtipus vinguin definits per diferents receptors de quimiocines i molècules d'adhesió suggereix diferents maneres d'actuació i d'interrelació amb el teixit que els envolta.

Una investigació bastant recent (Auffray 2007) ha estudiat la funció dels monòcits sanguinis *in vivo*, i ha descobert que un subgrup de monòcits s'encarrega de "patrullar" els teixits sans "rastrejant" l'endoteli vascular no inflammat. Aquesta població de monòcits residents expressa la integrina LFA-1 i el receptor de quimiocines CX₃CR1, i és necessària per la resposta immune precoç, possibilitant la migració ràpida cap als teixits i la diferenciació en macròfags.

III.2.6. Cèl.lules dendrítiques.

Les cèl.lules dendrítiques tenen un precursor comú amb els macròfags. El seu nom ve donat per la presència de processos citoplasmàtics dendrítics fins. Hi ha dos tipus principals de cèl.lules amb morfologia dendrítica i funcions ben diferenciades (Kumar 2005). Les *cèl.lules dendrítiques interdigitades* o simplement *cèl.lules dendrítiques*, són les CPA més importants en la iniciació de la resposta immune primària contra antigens proteics. La seva localització és òptima per a captar antigens: sota els epitelis i a l'espai intersticial de tots els teixits del cos. Les situades a l'epidermis s'anomenen cèl.lules de Langerhans.

Les cèl.lules dendrítiques expressen múltiples receptors per a capturar i respondre a gran quantitat de microbis i nombrosos antigens, a més de molècules del MHC de classe II. Tot això les fa especialment aptes per a presentar els antigens i activar les cèl.lules T CD4+.

Les *cèl.lules dendrítiques fol·liculars* són l'altre tipus de cèl.lula amb morfologia dendrítica. Es troben als centres germinals dels fol·licles limfoides de la melsa i dels ganglis limfàtics. Aquestes cèl.lules tenen receptors Fc per a la immunoglobulina G (IgG) i receptors per a la fracció C3b del complement. Per tant, poden atrapar antigens lligats a anticossos o a proteïnes del complement. Les cèl.lules dendrítiques fol·liculars presenten antigens a les cèl.lules B participant en la resposta immunitària humoral.

III.3. MEDIADORS QUÍMICS DE LA INFLAMACIÓ.

La simple enumeració de les substàncies que intervenen en el procés inflamatori ens dóna una idea de l'enorme complexitat que presenta. Però, entre les nombroses molècules que més abaix es citen, només uns pocs mediadors de la inflamació semblen tenir un paper realment important *in vivo*.

A la Taula III.1. es citen els mediadors químics que participen en la reacció inflamatòria. Només ens detindrem amb un cert detall en aquells que ens assemblen més rellevants per explicar el present treball, com són les citocines i les quimiocines. També farem una breu menció del paper de l'òxid nítric (NO) en el procés inflamatori. Són innumerables els treballs d'investigació sobre el NO en diferents camps que han aparegut en els darrers anys. Aquí només es farà un breu comentari, doncs una revisió a fons del tema no concorda amb els objectius de la present tesi doctoral.

Taula III.1.

MEDIADORS QUÍMICS DE LA INFLAMACIÓ.

1. Amines vasoactives.

- Histamina
- Serotonina

2. Proteïnes plasmàtiques.

- Sistema del complement.
- Sistema cinina.
- Sistema de la coagulació.

3. Metabòlits de l'àcid araquidònic.

- Prostaglandines.
- Leucotriens.
- Lipoxines.

4. Factor activador de plaquetes.

5. Citocines i quimiocines.

6. Òxid nítric.

7. Radicals lliures derivats de l'oxigen.

8. Constituents lisosòmics dels leucòcits.

9. Neuropèptids.

10. Altres.

III.3.1. Citocines.

Etimològicament la paraula *citocina* prové del grec i es podria traduir com "posar les cèl.lules en moviment".

Les citocines són proteïnes produïdes per molts tipus de cèl.lules que modulen les funcions d'altres tipus cel.lulars. Els principals productors de citocines són els limfòcits i els macròfags activats (Kumar 2005). Però també són secretades de manera important per les cèl.lules endotelials, epitelials i del teixit connectiu. De fet, totes les cèl.lules nucleades del cos produeixen citocines i expressen receptors de citocines a la seva membrana plasmàtica (Butterfield 2006).

Les citocines són substàncies solubles d'acció curta. Són mediadors intercel.lulars que regulen les interaccions múltiples entre limfòcits, monòcits, granulòcits i cèl.lules endotelials, entre d'altres. Les citocines derivades dels limfòcits s'anomenen limfocines, les produïdes pels monòcits monocines. Les interleucines (IL) serien les citocines responsables de la comunicació entre leucòcits. Més recentment, s'han introduït els termes adipocines i miocines per a designar, respectivament, les substàncies secretades pels adipòcits i les fibres musculars. Les quimiocines són citocines que afecten el moviment dels leucòcits (veure més avall). Recluten els diferents tipus de leucòcits cap el lloc on es troba la lesió o la inflamació (Charo 2006).

Les citocines són substàncies pleotròpiques. Una citocina és produïda per diferents tipus de cèl.lules i una mateixa citocina pot actuar sobre molts tipus cel.lulars. Poden actuar sobre la mateixa cèl.lula que les produeix (acció autocrina), sobre les cèl.lules veïnes (efecte paracrí) o bé poden tenir efectes a distància, actuant per via sistèmica (efecte endocrí).

Les citocines s'uneixen, a les cèl.lules diana, a receptors específics d'alta afinitat. El bloqueig del receptor per anticossos monoclonals específics té implicacions terapèutiques, per exemple, l'ús d'anti-TNF en l'artritis reumatoide.

Les citocines estan implicades en les respostes cel.lulars immunitàries. Les dues principals citocines que intervenen en la inflamació aguda són el *factor de necrosi*

tumoral alfa (TNF), també nomenat TNF- α , i la *interleucina-1* (IL-1). Són produïdes fonamentalment per macròfags activats.

La secreció de TNF i IL-1 pot ser estimulada per: endotoxines i altres productes microbians, immunocomplexos, toxines, agressions físiques i altres citocines. Les seves accions inflamatòries més importants les realitzen sobre l'endoteli, els leucòcits, els fibrocits i induint reaccions sistèmiques de fase aguda.

A nivell endotelial, la IL-1 i el TNF augmenten l'adherència leucocitària, i la producció de prostaciclina (PGI), augmenten l'activitat procoagulant i disminueixen l'activitat anticoagulant. També indueixen la síntesi d'altres citocines i quimiocines, com són IL-8, IL-6 i PDGF. Tanmateix incrementen la síntesi d'òxid nítric i la producció d'enzims associats amb la remodelació de la matriu extracel.lular.

Sobre els leucòcits, el TNF actua incrementant la secreció d'IL-1 i IL-6. El TNF és capaç d'augmentar la resposta dels neutròfils a altres mediadors de la inflamació.

Les accions del TNF i la IL-1 sobre els fibroblasts suposen un augment en la proliferació, en la síntesi de col.lagen, de proteasa i col.lagenasa, i un increment en la síntesi de prostaglandina E (PGE).

El TNF i la IL-1, així com la IL-6, indueixen respostes inflamatòries agudes de tipus sistèmic. Aquestes consisteixen en febre, pèrdua de la gana, alliberament de neutròfils a la circulació, alliberament de corticotropina i corticosteroids i trastorns del son (son d'ones lentes). Pel que fa al TNF, és el responsable dels efectes hemodinàmics del shock sèptic. El TNF també regula la massa corporal, afavorint la mobilització de lípids i proteïnes. La producció mantinguda de TNF s'ha associat a la caquèxia.

La IL-10 i el factor de transformació del creixement beta (TGF- β) són citocines amb propietats fonamentalment antiinflamatòries.

III.3.2. Quimiocines.

Les quimiocines són una família de proteïnes petites (de 8 a 10 kD) que actuen bàsicament com a quimioatracients per a tipus específics de leucòcits. Com el seu nom indica són "citocines quimiotàctiques" (Charo 2006). S'han identificat al voltant de 40 quimiocines diferents i uns 20 receptors per a les mateixes. Es classifiquen en 4 grups principals d'acord amb la disposició dels residus de cisteïna (C).

1. Quimiocines C-X-C. També anomenades *quimiocines alfa* (α). Actuen primàriament sobre els neutròfils. El prototipus d'aquest grup és la IL-8. És secretada pels macròfags activats, per les cèl.lules endotelials i per altres tipus cel.lulars. Provoca l'activació i la quimiotaxi dels neutròfils, amb una activitat més limitada sobre monòcits i eosinòfils. Els seus inductors és importants són els productes microbians i altres citocines, fonamentalment la IL-1 i el TNF.
2. Quimiocines C-C o *quimiocines beta* (β). A aquest grup pertanyen la proteïna quimioatracient de monòcits (MCP-1), l'eotaxina, la proteïna 1- α inflammatòria dels macròfags (MIP-1 α), i RANTES. Aquesta darrera és regulada, expressada i secretada per la cèl.lula T normal. Generalment atrauen monòcits, eosinòfils, basòfils i limfòcits, però no neutròfils. Encara que la majoria de les quimiocines d'aquesta classe tenen propietats superposades, la *eotaxina* recluta selectivament eosinòfils.
3. Quimiocines C o *quimiocines gamma* (γ). Són relativament específiques dels limfòcits (per ex. *Linfotactina*)
4. Quimiocines CX₃C. L'únic membre conegut d'aquesta classe és la *fractalcina*, que promou una adhesió ferma de monòcits i cèl.lules T.

En resum, les principals subfamílies de quimiocines són C-X-C i C-C. Les C-X-C són produïdes principalment pels macròfags activats i les cèl.lules dels teixits (p.ex., endoteli), mentre que les quimiocines C-C són sintetitzades en gran mesura per les cèl.lules T.

Les quimiocines estimulen el reclutament de leucòcits en la inflamació i controlen la migració normal de cèl.lules a través de diversos teixits (Kumar 2005). Es poden secretar transitòriament en resposta a estímuls inflamatoris o bé ser produïdes de manera constitutiva en certs teixits.

Per ser actives les quimiocines s'han d'unir als seus receptors. Els receptors de quimiocines es troben acoblats a les set proteïnes G transmembrana. S'anomenen CXCR i CCR els que corresponen respectivament a les quimiocines C-X-C i C-C. Aquests receptors presenten especificitats solapades pels diferents lligands, i els leucòcits solen expressar més d'un tipus de receptor.

Certs receptors de quimiocines (CXCR-4 i CCR-5) actuen com a coreceptors per a una glucoproteïna de la coberta del virus de la immunodeficiència humana (VIH), estant implicats en la fixació i l'entrada del virus a les cèl.lules.

III.3.3. Factor nuclear kappa B.

El *factor nuclear kappa B* (NF- κ B) va ser descobert l'any 1986 (Sen 1986). Des d'aleshores ha despertat un interès creixent en la literatura científica, degut a la manera inusual de regular-se i a que controla diferents gens i respostes biològiques molt importants per a la vida cel.lular.

El NF- κ B és un *factor de transcripció*. Els factors de transcripció són proteïnes que coordinen i regulen l'expressió d'un gen o d'un grup de gens. En molts casos regulen la seva pròpia expressió, però també és freqüent que regulin l'expressió d'altres factors de transcripció. Els factors de transcripció poden interaccionar amb regions específiques de l'ADN, amb elements de la maquinària de la transcripció (pas d'ADN a mRNA), amb altres factors de transcripció, o amb altres molècules. Els factors de transcripció són estimulats per senyals citoplasmàtiques. Al ser activats adquireixen la capacitat de regular l'expressió gènica en el nucli cel.lular, actuant sobre la transcripció de diferents gens, bé activant-la o bé reprimint-la. Els factors de transcripció poden ser activats o desactivats selectivament per altres proteïnes, dins de la cadena de transmissió de senyals intracel.lulars.

El NF- κ B el componen dues subunitats (P50 i P65). Inicialment aquest dímer es localitza al citoplasma cel.lular, on hi ha una petita molècula inhibidora ("inhibitor kappa B alpha" o I κ B α) que es fixa al NF- κ B retenint-lo al citoplasma en la seva forma inactiva. També a nivell citoplasmàtic es troba un enzim (la "I κ B kinasa" o IKKB) que

és capaç de fosforilar el I κ B α . Una vegada fosforilada la molècula d'I κ B α ja no es pot mantenir unida al NF- κ B. El NF- κ B lliure (activat) es transloca fins al nucli cel.lular on activa la transcripció de gens implicats en processos immunitaris i inflamatoris, així com gens involucrats en el control del creixement cel.lular i l'apoptosi.

El NF- κ B pot ser activat ràpidament, en qüestió de minuts, per una gran varietat d'estímuls: citocines inflamatòries (TNF i IL-1), senyals d'activació de cèl.lules T, factors de creixement i inductors d'estrès (Baldwin 2001).

Així mateix, el NF- κ B regula positivament gens que codifiquen citocines, receptors de citocines, molècules d'adhesió cel.lular, proteïnes quimioattractives i factors de creixement.

Donat que el NF- κ B regula els gens responsables de la inflamació s'ha plantejat que podria jugar un paper en aquelles malalties en les que hi ha un component inflamatori. Així, doncs, l'activació del NF- κ B s'ha associat a l'aterosclerosi, l'asma, l'artritis, el càncer, la diabetis, la malaltia per VIH, la malaltia inflamatòria intestinal, l'ictus (AVC), i la caquèxia, entre d'altres.

Es esperançadora la possibilitat d'actuar sobre el NF- κ B, bloquejant la seva activació, per tal de curar o modular l'expressió de determinades malalties. Així, s'ha vist que l'aspirina, altres antiinflamatoris no esteroïdals i els glucocorticoides, bloquegen l'activació del NF- κ B. Actualment s'estan investigant fàrmacs que tinguin com a diana el NF- κ B.

El fet que el NF- κ B controli els mecanismes de mort cel.lular programada (apoptosi) ha generat interès en la teràpia del càncer. Tanmateix, l'apoptosi és el principal mecanisme de mort de les cèl.lules neoplàssiques sotmeses a quimioteràpia (QT) i radioteràpia (RT). En cultius cel.lulars, al suprimir l'activació del NF- κ B es consegueix la mort d'un nombre major de cèl.lules en resposta a aquests tractaments (QT i RT).

Finalment, hi ha evidències que demostren que el NF- κ B és activat per diferents oncoproteïnes. Sembla ser que el NF- κ B seria necessari perquè algunes oncoproteïnes

induïssin la transformació cel.lular. El NF-kB participaria, doncs, en l'oncogènesi per dos mecanismes: suprimint l'apoptosi i induint la proliferació cel.lular.

III.3.4. Òxid nítric.

L'òxid nítric (NO) es considera un mediador pleiotròpic de la inflamació (Kumar 2005). Va ser descobert com un factor que era alliberat per les cèl.lules endotelials i que provocava la relaxació del múscul llis vascular i, per tant, vasodilatació. Inicialment va ser anomenat "factor relaxant derivat de l'endoteli".

El NO és un gas soluble que, *in vivo*, té una semivida de només uns segons. Avui dia sabem que no solament és produït per les cèl.lules endotelials, sinò també pels macròfags i per algunes neurones del cervell. El NO és sintetitzat per l'enzim òxid nítric sintetasa (NOS) a partir de la L-arginina.

Hi ha tres tipus de NOS:

- Òxid nítric sintetasa induïble (iNOS)
- Òxid nítric sintetasa endotelial (eNOS)
- Òxid nítric sintetasa neuronal (nNOS)

La eNOS i la nNOS s'expressen constitutivament i a nivells baixos, i poden activar-se ràpidament per un augment en els ions de calci citoplasmàtics. L'aportació de calci a les cèl.lules dóna lloc a una ràpida producció de NO. Per contra, la iNOS és induïda quan els macròfags i altres cèl.lules s'activen per l'acció de citocines (TNF, IFN- γ ...) o d'altres agents.

Totes les isoformes de NOS utilitzen l'aminoàcid L-arginina com a substracte i necessiten una sèrie de cofactors per a la seva acció enzimàtica. A més, totes elles són inhibides per la dimetilarginina asimètrica (ADMA). El NO actua de forma paracrina sobre les cèl.lules diana mitjançant la inducció de monofosfat cíclic de guanosina (GMP).

A nivell endotelial, el NO té una estreta relació amb les endotelines i els seus receptors. La síntesi de NO a aquest nivell es fa mitjançant la eNOS. S'han descrit anomalies en la producció endotelial de NO en l'arteriosclerosi, la diabetis i la hipertensió.

El NO no solament participa en el control de la tensió arterial; també intervé en la regulació dels processos inflamatoris.

III.3.4.1. Òxid nítric i inflamació.

El NO juga un paper important en la resposta inflamatòria actuant sobre els components cel·lular i vascular de la inflamació. Ja hem comentat que és un vasodilatador potent. A més a més, el NO redueix l'agregació i l'adhesió plaquetàries, serveix com a regulador del reclutament leucocitari i inhibeix certes característiques de la inflamació induïda pels mastòcits. S'ha vist que la producció endògena de NO redueix les respostes inflamatòries.

La síntesi de NO es troba augmentada en algunes malalties inflamatòries, com l'asma, l'artritis, la malaltia inflamatòria intestinal i la sèpsia (Kolb-Bachofen 2006). En general, aquestes malalties inflamatòries es caracteritzen per l'expressió de la isoforma iNOS. Aquesta última, per expressar-se, necessita senyals com les citocines proinflamatòries i/o productes bacterians del tipus de les endotoxines. Sota la influència d'aquests estímuls, el NO és sintetitzat via la iNOS, per un període relativament llarg de temps, que pot arribar a ser d'alguns dies, en contraposició al que passa amb la eNOS i la nNOS, que sintetitzen el NO en forma d'impulsos molt breus (veure més amunt). Inicialment es pensava que aquesta producció "prolongada" de NO era exclusivament un mecanisme de defensa immunitària contra els patògens, éssent tòxica per a ells a altes concentracions. Amb posterioritat, paradoxalment, s'ha vist que el NO produït per la via de la iNOS pot presentar una acció protectora en front de l'estrès. Té una acció supressora sobre la infiltració leucocitària i compleix una important tasca regulant a la baixa el procés inflamatori. En resum, el NO derivat de la síntesi de la iNOS podria representar per a l'organisme una senyal beneficiosa, que vindria a disminuir la resposta inflamatòria. De fet, estudis recents apunten que una

insuficient producció de NO durant la inflamació, contribuiria a la cronicitat de les malalties (Kolb-Bachofen 2006).

Com s'apuntava més amunt, el NO també participa en el control de les infeccions. El NO i els seus derivats presenten activitat antimicrobiana. La producció de NO augmenta durant la resposta de l'hoste a la infecció. A més, els intermediaris de nitrogen reactius, derivats del NO, són microbicides.

III.3.4.2. Òxid nítric i múscul esquelètic.

Comentarem breument tres estudis que han avaluat l'expressió de les diferents isoformes de NOS al M. estriat dels pacients amb MPOC.

El nostre grup (Barreiro 2003) no va detectar iNOS en el M. esquelètic dels malalts amb MPOC moderada. Tampoc es van observar diferències en els nivells d'eNOS ni de nNOS entre els pacients amb MPOC i els individus control. Alternativament, Agustí *et al.* (Agustí 2004) varen trobar que, en el múscul de pacients amb MPOC severa i baix pes, hi havia activació del NF-kB i inducció de la iNOS. Adicionalment, l'equip de Montes de Oca (Montes de Oca 2005) va descriure que hi havia nivells superiors d'expressió de la iNOS en els malalts amb MPOC respecte als controls sans. Per contra, l'expressió de la eNOS era inferior. En aquest últim estudi, els malalts presentaven un major grau d'obstrucció a la via aèria (FEV1 $43 \pm 11\%$ *pred*) que els nostres pacients.

Fins aquí s'han exposat aspectes generals del procés inflamatori. En els propers capítols, el lector pot trobar una revisió més específica d'aspectes concrets de la inflamació vinculats a cadascun dels temes que es tracten.

IV. LA SÍNDROME D'APNEES I HIPOPNEES DEL SON.

La primera referència que hi ha a la bibliografia mèdica del que avui dia es coneix com la *Síndrome d'apnees-hipopnees del son* (SAHS), la trobem l'any 1973 (Guilleminault 1973). Però no va ser fins l'any 1976 que el mateix autor va introduir el terme síndrome d'apnea del son per descriure aquesta entitat (Guilleminault 1976). Des d'aleshores s'ha anat observant un interès creixent per la malaltia. Interès plenament justificat tant per la seva alta prevalença com per la morbimortalitat associada.

La SAHS es caracteritza per ésser un trastorn que cursa amb episodis repetitius d'obstrucció de la via aèria superior (VAS) durant el son. Aquests provoquen constants dessaturacions de l'oxihemoglobina y/o despertars transitoris que donen lloc a un son no reparador, que es manifesta clínicament per una excessiva somnolència diürna, cansament crònic, alteracions cognitives i problemes a nivell cardiovascular i respiratori.

Els estudis epidemiològics han demostrat una elevada prevalença de la SAHS, al voltant d'un 5% en homes i un 2% en dones de mitjana edat (Young 1993, Young 2002). La seva freqüència s'incrementa amb l'edat. Malgrat que cada vegada disposem d'un coneixement més acurat de la malaltia, hi ha evidències que es tracta d'una patologia infradiagnosticada arreu del món. Aquestes dades semblen confirmar-se en els estudis duts a terme en el nostre país. En concret, es calcula que hi ha entre 1.200.000 i 2.150.000 persones afectades de SAHS a Espanya, i que només s'han diagnosticat i tractat entre un 5 i un 9 % (Durán-Cantolla 2004).

Es considera que la SAHS és, avui dia, un problema de salut pública de gran transcendència. Tant la hipersòmnia com els roncs tenen un important impacte familiar, laboral i social. Són freqüents el deteriorament de les relacions personals i socials, l'absentisme laboral i els accidents de trànsit, laborals i domèstics. A més, la SAHS té una clara vinculació amb els factors de risc cardiovascular, doncs és ben coneguda la seva associació amb l'obesitat i la hipertensió arterial, així com amb la cardiopatia isquèmica i els accidents vasculars cerebrals de tipus isquèmic. Tot això ens dóna una idea de la important comorbilitat i mortalitat associada a la SAHS, incidint en les patologies més prevalents que pateixen actualment els països desenvolupats.

IV.1. CONCEPTES.

Es defineix com apnea la interrupció del flux aeri bucal, nasal o ambdós de, al menys, 10 segons de durada (American Academy of Sleep Medicine 1999). La hipoapnea s'identifica en constatar la disminució del flux aeri naso-bucal major del 50%, i de més de 10 segons de durada, acompanyada d'una dessaturació de l'oxihemoglobina superior a un 4% i/o d'un despertar transitori (*arousal*). Es considera patològica la demostració en un estudi polisomnogràfic de més de 10 episodis d'apnees i hipopnees per hora de son. Una xifra superior a 30 episodis es considera greu (Montserrat 2004). Recentment s'ha proposat una altra definició d'hipopnea per part del Grupo Español de Sueño (Consenso SAHS 2005) que no s'ha utilitzat en el present treball, donat el seu caràcter multicèntric i plurinacional.

Hi ha tres tipus d'apnees: *obstructives*, *centrals* i *mixtes*. La SAHS es caracteritza per presentar apnees obstructives durant el son, és a dir, hi ha una obstrucció i/o col.lapse de la VAS que impedeix el pas de l'aire. Les apnees obstructives s'acompanyen d'un esforç respiratori per a intentar vèncer la interrupció del flux aeri provocat pel tancament de la VAS. L'esforç respiratori s'objectiva en comprovar moviments a nivell de les bandes toràciques i abdominals que porta el pacient durant la prova diagnòstica (polisomnografia). Per contra, les apnees centrals es defineixen com la cessació del flux aeri enregistrat a nivell nasal i bucal però amb interrupció dels moviments respiratoris. Les apnees centrals tindrien el seu origen en estructures del sistema nerviós central (alteracions del centre respiratori) i també es veuen en malalties diferents a la SAHS. El tercer tipus d'apnees, les mixtes, presenten una interrupció del flux aeri amb una absència inicial d'esforç respiratori, que apareix més tard durant l'episodi d'apnea, però que no aconsegueix restablir el pas de l'aire.

La interrupció del flux aeri, completa (apnea) o incompleta (hipopnea), pot repetir-se desenes de vegades en una sola nit, i dia rera dia durant anys, donant lloc a importants i repetides dessaturacions d'oxigen i a uns despertars subclínic, transitoris i subconscients, nomenats "arousals". Tot això condueix a importants trastorns cardio-respiratoris i a una marcada desestructuració de l'arquitectura del son, que és la principal responsable dels símptomes neuropsiquiàtrics.

IV.2. ETIOPATOGÈNIA DE LA SAHS.

IV.2.1. Visió de conjunt. Esdeveniments considerats globalment.

Ja s'ha comentat com les apnees i les hipopnees que caracteritzen a la SAHS són degudes a l'oclusió intermitent de la VAS. El col.lapse faríngic i la cessació del flux aeri es produeixen durant la *inspiració*, com a resultat de la *pressió negativa intraluminal* generada per la contracció del diafragma. L'oclusió es veu afavorida per la flaccidesa i la hipotonia muscular faríngies que es produeixen durant el son, sobretot si coexisteixen determinades anomalies anatòmiques i funcionals del tracte respiratori superior. La faringe és l'única zona de tota la via aèria amb parets toves i col.lapsables, ja que la resta té un suport rígid, ossi o cartilaginós.

Cada apnea dóna lloc a hipoventilació, i aquesta a *hipoxèmia* i *hipercàpnia* que, detectades pels quimiorceptors, provoquen un canvi progressiu de la pressió intrapleural, que éssent cada vegada més negativa, acabarà per restablir el flux d'aire a la faringe. Això provoca un ronc intens i sorollós i un microdespertar subclínic i transitori que, en repetir-se durant la nit, comporta una desestructuració de l'arquitectura normal del son. Aquest son fragmentat no assoleix les fases més profundes i, per tant, no és veritablement reparador.

Durant la inspiració normal, la contracció dels músculs respiratoris, sobretot del diafragma, crea una pressió intratoràcica negativa, que és la responsable del moviment d'aire cap a les vies aèries inferiors i els alvèols pulmonars. Aquesta mateixa pressió negativa o de succió té tendència a col.lapsar les parets de la faringe, fet que en situacions normals no es produeix gràcies a la contracció dels músculs locals (M. dilatadors de la faringe). Normalment, els M. dilatadors de la faringe s'activen abans que no es produeixi la contracció del diafragma, preparant la VAS pel pas de l'aire (Malhotra 2002). Com ja hem comentat més amunt, quan dormim, en especial a les fases profundes del son no REM i a la fase REM, es produeix una gran hipotonia muscular però amb la preservació del diafragma. Així doncs, hi ha una disminució fisiològica de l'activitat de la musculatura faríngia respecte a la del diafragma. Hom coneix que es necessita una perfecta coordinació entre els músculs respiratoris i els faríngics per tal d'aconseguir una ventilació adequada. Alguns estudis suggereixen que aquesta situació es trobaria alterada en malalts amb SAHS.

IV.2.2. Alteracions anatòmiques associades a la SAHS.

Hi ha una sèrie d'alteracions anatòmiques i funcionals de la via aèria superior que poden afavorir l'aparició d'apnees i hipopnees (Taula IV.1.).

Des del punt de vista anatòmic la major part dels malalts amb SAHS tenen una via aèria de calibre disminuït a nivell de la faringe. Aquesta VAS amb una llum més petita pot ser deguda a l'obesitat, a alteracions òssies, o a les amígdales i adenoides (nens). El factor més important de tots és l'obesitat, tant per la seva freqüència com per la repercussió clínica i sanitària que comporta. S'ha comprovat que l'acúmul de greix a les parts toves de la VAS comporta una disminució del diàmetre de la llum de la faringe.

Moltes de les altres alteracions esmentades a la taula tenen en comú la reducció de la llum de la VAS, la qual augmenta la resistència al pas de l'aire i afavoreix el col.lapse de les parets faríngies.

Un altre aspecte important fa referència a la relació postural de les apnees. El decúbit supí afavoreix la presència d'apnees obstructives, que són molt menys freqüents en *decúbit lateral i prono*. Al dormir cara amunt es produeix un desplaçament posterior de la llengua i del paladar tou, que amb la relaxació muscular provocada pel son pot arribar a tancar la llum de la VAS.

Taula IV.1.ALTERACIONS ANATÒMIQUES ASSOCIADES A LA SAHS.**1. Anomalies estructurals o funcionals de les fosses nasals o de l'orofaringe:**

Desviació de l'envà nasal, pòlips o tumors nasals, hipertròfia dels cornets nasals, adenoides o tumors rinofaringis, macroglòssia, plecs faringo-amigdalars hipertròfics, hipertròfia amigdalars o velopalatina, i micrognatia, retrognatia i d'altres defectes estructurals del massís facial.

2. Trastorns neuromusculars que afecten l'orofaringe:

Distròfia miotònica, siringomièlia, poliomièlitis, esclerosi lateral amiotròfica, miopaties.

3. Enguixament de les parets de la via aèria superior per dipòsits de greix o d'altres substàncies:

Obesitat, limfomes i altres tumors, goll, lipomatosi, masses cervicals de qualsevol origen.

4. Malalties endocrinometabòliques:

Obesitat, acromegàlia, hipotiroïdisme, amiloïdosi i tesaurismosi.

IV.2.3. Trastorns funcionals associats a la SAHS.

Un altre factor clau en la fisiopatologia de la SAHS és l'activitat dels M. dilatadors de la faringe (MDF). La VAS es manté oberta gràcies a l'activitat d'aquest grup muscular. El principal MDF i el més estudiat és el M. genioglòs de la llengua.

Els MDF responen a una sèrie d'estímuls entre els que destaquen la pressió negativa a la VAS i les alteracions dels gasos arterials (hipoxèmia i hipercàpnia). L'increment de la pressió negativa a la VAS, deguda al seu calibre petit, provoca un augment de l'activitat dels MDF, que aconsegueixen mantenir la VAS permeable i, per tant, respirar amb normalitat quan els pacients amb SAHS estan desperts. Durant el son, els malalts amb SAHS presenten una disminució d'aquest reflex de pressió negativa, i els MDF no són capaços de mantenir permeable la VAS, produint-se apnees i hipopnees (White 2006).

L'increment de la pressió arterial de diòxid de carboni (PaCO_2) que es produeix durant l'apnea també és capaç d'augmentar l'activitat dels MDF. S'ha observat una variabilitat interindividual en aquesta resposta reflexa, de tal manera que hi ha subjectes que poden mantenir la VAS oberta i, per tant, tenir una bona qualitat del son. D'altres, però, necessitaran una major estimulació i activació dels MDF, que només s'aconseguirà amb un despertar o *arousal*. Això explicaria que individus amb una VAS anatòmicament molt similar presentin grans diferències quant a la gravetat de la SAHS.

En individus amb SAHS el control de la ventilació a nivell central és inestable. L'impuls ventilatori i la resposta a la hipòxia i la hipercàpnia són inadequades, contribuint a l'aparició dels trastorns respiratoris durant el son (Malhotra 2002).

Un altre aspecte funcional que s'ha vinculat a la fisiopatologia de la SAHS ha estat l'anomenat llindar d'arousal. Ja hem vist com en pacients amb SAHS eren necessaris els microdespertars electroencefalogràfics perquè l'apnea finalitzés. Dit d'una altra manera, *l'arousal* fa possible l'activació dels MDF perquè s'obri la VAS, que es trobava tancada degut a la hipotonia provocada pel son. Alguns individus amb SAHS presentarien microdespertars en resposta a una estimulació respiratòria mínima (llindar

d'arousal baix), la qual cosa es traduiria en una major fragmentació del son i més gravetat de la malaltia (White 2006).

IV.2.4. Fisiopatologia de les complicacions cardiovasculars.

Les apnees obstructives poden induir importants alteracions en l'intercanvi de gasos al pulmó, que són les responsables del risc augmentat de patir malalties cardiovasculars i cerebrovasculars que s'observa a la SAHS. Les apnees i hipopnees donen lloc a episodis repetits d'*hipoxèmia* i *hipercàpnia*, que provoquen directament *vasoconstricció arterial* pulmonar i, de manera indirecta i per mecanismes més complexos, vasoconstricció a nivell sistèmic. D'altra banda, els esforços respiratoris que apareixen a cada apnea produeixen fluctuacions en la pressió intratoràcica i canvis al sistema nerviós vegetatiu. S'han descrit tot un seguit de complexes modificacions neurohumorals, amb un augment resultant del *to simpàtic adrenèrgic*, que contribuiria a l'elevació de la pressió arterial pulmonar i sistèmica, incrementant-se el risc de patir complicacions cardiovasculars. La cefalea matutina que s'observa en molts pacients és deguda a la vasodilatació cerebral ocasionada per la hipercàpnia.

IV.3. MANIFESTACIONS CLÍNiques.

Malgrat són nombrosos els símptomes associats a la SAHS, la tríada clínica clàssica és: *hipersòmnia diürna*, *roncs*, i pauses respiratòries (*apnees*) objectivades habitualment per la família.

La SAHS és 2 o 3 vegades més freqüent en homes que en dones, si bé a partir de la menopausa el risc té tendència a igualar-se. També és més freqüent en persones obesas, havent-se demostrat que la circumferència del coll (perímetre cervical) és un bon predictor de la malaltia.

Les manifestacions clíniques de la SAHS seran les derivades dels fenòmens fisiopatològics que es van repetint al llarg de la nit, com són la *desestructuració del son*, els trastorns en *l'intercanvi gasós pulmonar* i les alteracions derivades de canvis en la *secreció hormonal* (veure Taula IV.2.).

El símptoma més freqüent referit pel malalt o pels seus familiars és el ronc. Aquest és el soroll resultant de la vibració de les parts toves de la VAS (parets de la faringe, vel del paladar i úvula). El ronc cada vegada es fa més sonor com a conseqüència de l'augment de l'activitat dels músculs respiratoris, que intenten vèncer l'estrenyiment de la faringe i la dificultat al pas de l'aire que comporta. Quan finalment es produeix el col.lapse de la faringe, la hipoxèmia i la hipercàpnia resultants estimulen els moviments tòracoabdominals (esforç respiratori), que cada cop són més intensos, podent fer-se fins i tot paradoxals. Per acabar, el silenci de l'apnea es trenca amb un ronc estertorós, que indica el restabliment de la permeabilitat de la via aèria. Els gasos respiratoris en sang es normalitzen i el son es recupera, fins a l'inici d'un proper cicle, que sol anar-se repetint al llarg de la nit moltes vegades.

El símptoma més característic de la SAHS és la somnolència diürna excessiva. És molt limitant, éssent causa d'incapacitat laboral i d'accidents de trànsit i al treball. Al final de cada apnea el pacient presenta un despertar subclínic que, com es va repetint durant tota la nit, impedeix un descans profund i reparador, i dóna lloc a la hipersòmnia diürna i a les altres manifestacions neuropsiquiàtriques pròpies de la malaltia. Així, s'han descrit trastorns de la conducta i de la personalitat (depressió, irritabilitat, paranoïa...), pèrdua de la memòria, deteriorament cognitiu, i disminució de l'habilitat motora i de la destresa perceptiva.

Durant la nit també són habituals les sacsejades de les extremitats (tant a membres inferiors com superiors), els despertars sobtats amb sensació d'asfíxia, els moviments corporals bruscs que provoquen caigudes del llit i, amb menys freqüència, el sonambulisme i la somnilòquia. Tot això com a expressió d'un son irregular i agitat.

Taula IV.2.

MANIFESTACIONS CLÍNiques A LA SAHS.

1. Desestructuració i fragmentació del son:

- a) Hipersòmnia.
- b) Son agitat, inquiet
- c) Alteracions neuropsiquiàtriques:
 - Síndrome depressiva
 - Irritabilitat o paranoïa
 - Deteriorament intel·lectual
 - Trastorns de la conducta i de la personalitat
 - Pèrdua de la memòria
 - Disminució de les habilitats motores

2. Trastorns en l'intercanvi de gasos: hipoxèmia i hipercàpnia.

- a) Complicacions cardíaques: arítmies, cardiopatia isquèmica, mort sobtada.
- b) Hipertensió arterial
- c) Hipertensió pulmonar
- d) Cefalees matutines
- e) Poliglobúlia

3. Trastorns en la secreció hormonal:

- a) Disminució de la líbido
- b) Nictúria
- c) Retard en el creixement (nens)

IV.3.1. Conseqüències clíniques de la SAHS.

Les conseqüències de la SAHS poden ser dividides en dues categories: *neurocognitives* i *cardiovasculars*.

La disfunció cognitiva a la SAHS s'ha objectivat en diferents àrees: *atenció/vigilància*, *memòria*, *aprenentatge* i *funcions executives*. Amb freqüència, els pacients amb SAHS es queixen de dificultat per a concentrar-se, i de tenir una capacitat disminuïda per a mantenir l'atenció i la vigilància. S'ha relacionat la hipersònnia diürna amb aquestes deficiències. Estan ben documentats els trastorns de la memòria en malalts amb SAHS, sobretot pel que fa a la memòria a llarg termini, si bé estudis posteriors també han observat una disminució de la memòria recent. Per funcions executives s'entenen les funcions cognitives que fan referència a tasques com són la resolució de problemes, la capacitat de fer plans i adequar la conducta per tal de complir uns objectius, i les habilitats visuomotors, entre d'altres. S'han descrit dèficits en aquests camps en els pacients amb SAHS i, en alguns casos, s'han relacionat amb el grau d'hipoxèmia (Décarý 2000).

Les alteracions cardiovasculars associades a la SAHS són nombroses. La SAHS ha estat proposada com un factor de risc cardiovascular, havent-se mostrat que contribueix al desenvolupament de l'arteriosclerosi. Els estudis d'investigació clínica suggereixen un paper cada cop més important de la SAHS en les malalties cardiovasculars (Caples 2005). La prevalença d'*hipertensió arterial* (HTA) a la SAHS és més elevada que la detectada a la població general. A més, hi ha evidències de que el tractament de la SAHS incideix en el control de la HTA. Altres patologies relacionades amb la SAHS han estat els *ictus* (accidents vasculars cerebrals), la *cardiopatia isquèmica* (infart de miocardi) i la *insuficiència cardíaca*. Al menys un 10% dels malalts amb insuficiència cardíaca presenten una SAHS clínicament rellevant.

També existeix una freqüència augmentada d'*arítmies cardíques* a la SAHS. En concret, s'ha vist un increment dels casos de fibril·lació auricular. A més, la recurrència de l'arítmia és major en els pacients amb SAHS no tractada. Altres trastorns del ritme que s'han descrit són la bradicàrdia sinusal, aturades sinusals, bloqueigs aurículoventriculars i arítmies ventriculars. La importància clínica d'aquestes arítmies i la seva possible relació amb la mort sobtada nocturna queden per determinar.

IV.4. DIAGNÒSTIC DE LA SAHS.

La presència d'un nombre anormal d'apnees/hipopnees durant el son associada a símptomes relacionats amb la malaltia permet el diagnòstic de SAHS.

El diagnòstic definitiu de SAHS es fa mitjançant la Polisomnografia nocturna (PSG), que ens permet mesurar les variables fisiològiques tant del son com respiratòries. L'*electroencefalograma* (EEG), el registre dels *moviments oculars* i l'*activitat motora del M. genioglòs* ens serviran per avaluar les fases del son i la seva qualitat. El *flux aeri a nivell nasobucal*, els *moviments tòracoabdominals* i la *saturació d'oxihemoglobina*, ens permetran identificar les apnees i hipopnees, distingir entre les apnees obstructives i les centrals i objectivar el grau de dessaturació de la hemoglobina (Montserrat 2004).

Malgrat la PSG és la prova de referència per a establir el diagnòstic de SAHS, avui en dia es realitzen estudis simplificats que avaluen les variables respiratòries i cardíaques, anomenats Poligrafia respiratòria (PR). La PR és una alternativa vàlida per a la major part dels pacients amb SAHS, i pot realitzar-se amb facilitat al domicili del malalt (Consenso SAHS 2005).

IV.5. TRACTAMENT DE LA SAHS.

Els dos pilars bàsics del tractament de la SAHS són les mesures higienicodietètiques i la utilització de Pressió Positiva Constant a la Via Aèria (CPAP, de l'anglès *Continuous Positive Airway Pressure*). En pacients amb anomalies anatòmiques ben identificades s'hauria de valorar el tractament quirúrgic.

IV.5.1. Mesures generals.

Constitueixen la primera fase del tractament. S'han de reduir els factors de risc per a SAHS. Així, doncs, haurem de tractar l'*obesitat* i evitar circumstàncies que poden empitjorar la SAHS com són el consum d'*alcohol*, els *hipnòtics i sedants* i el *tabac*. Les mesures higièniques respecte al son comprenen, entre d'altres, evitar tant la seva privació com el dormir en decúbit supí.

IV.5.2. Pressió positiva constant a la via aèria (CPAP).

La utilització de CPAP nasal constitueix, avui dia, el tractament d'elecció pels malalts amb SAHS. La CPAP ha demostrat ser més efectiva que el placebo per millorar la somnolència i la qualitat de vida dels pacients. A més, és més efectiva que els dispositius d'administració oral per millorar les apnees i hipopnees (Giles 2006). La CPAP està indicada principalment a la SAHS moderada i greu.

La CPAP va ser desenvolupada per Sullivan *et al.* l'any 1981 (Sullivan 1981). Consisteix en un sistema capaç de transmetre una pressió predeterminada a una màscara nasal adaptada i fixada a la cara del pacient. En tractar-se d'un circuit tancat, la pressió positiva es transmet a la VAS evitant el seu col.lapse.

La CPAP corregeix les apnees obstructives, mixtes i, fins i tot, les centrals, elimina les hipopnees i és capaç de suprimir els roncs. Evita les dessaturacions d'oxigen, els despertars electroencefalogràfics i normalitza l'arquitectura del son (Consenso SAHS 2005).

Així, doncs, la CPAP permet controlar els símptomes dels malalts amb SAHS. Elimina la hipersòmia diürna, permet la recuperació de les funcions cognitives i millora la qualitat de vida. A més, el tractament amb CPAP disminueix el risc d'accidents de trànsit i permet el control de la tensió arterial en un gran nombre de subjectes amb SAHS i hipertensió. Els pacients amb una SAHS més greu són els que assoleixen una reducció més important de les xifres tensionals. A més a més, estudis amb ecocardiografia i gammagrafia cardíaca han demostrat una millora en la fracció d'ejecció del ventricle esquerre i en els índex de funció diastòlica en pacients tractats amb CPAP. Darrerament s'ha publicat el primer estudi sobre mortalitat en malalts amb insuficiència cardíaca i SAHS (Wang 2007). El grup de pacients que va rebre tractament amb CPAP va presentar una menor mortalitat que els malalts no tractats.

Malauradament, els estudis que intenten avaluar el risc cardiovascular en pacients amb SAHS, i els efectes beneficiosos de la CPAP en aquest camp, es troben amb la limitació que la SAHS coexisteix moltes vegades amb la síndrome metabòlica, dificultant l'establiment d'una relació de causa-efecte (Stradling 2007).

En malalts amb més de 30 apnees-hipopnees per hora durant la nit, però sense hipersòmnia diürna o altres símptomes associats a la malaltia, no s'ha demostrat l'eficàcia terapèutica de la CPAP.

IV.5.3. Cirurgia.

La cirurgia de l'àrea otorinolaringològica (ORL) i/o màxil.lofacial està indicada en casos seleccionats de SAHS amb anomalies anatòmiques. També es proposa a alguns pacients que no toleren la CPAP.

La primera tècnica quirúrgica que va demostrar utilitat a la SAHS va ser la *traqueotomia*, que era capaç d'eliminar les apnees i la simptomatologia associada, malgrat que era una tècnica força molesta pels pacients. Actualment es disposa d'un ampli ventall de possibilitats quirúrgiques per tal de corregir la roncopatia i la SAHS.

Podríem resumir dient que s'apliquen tècniques de *cirurgia nasal* (septes, turbines), *lingual* (reducció de la base de la llengua), *màxil.lofacial* (alteracions morfològiques de l'esquelet facial) i *palatofaríngia*. Dintre de les diferents tècniques emprades en aquest darrer grup cal destacar l'uvulopalatofaringoplàstia (UPPP) que, malgrat ser una tècnica força cruenta, ha demostrat la seva eficàcia en estudis ben dissenyats. Les noves tècniques de ressecció amb làser o radiofreqüència semblen aportar una major seguretat al pacient que la cirurgia convencional (Consenso SAHS 2005).

La major part de casos de SAHS en nens són deguts a l'increment del tamany de les amígdals i/o adenoides. L'extirpació d'aquestes és el tractament d'elecció.

En conclusió, la indicació de cirurgia a la SAHS s'ha de fer de manera individualitzada, atenent-se a les alteracions anatòmiques que s'hagin objectivat, la gravetat de la SAHS, el risc quirúrgic i els desitjos que manifesti el pacient després de ser adequadament informat.

IV.5.4. Altres tractaments.

Els dispositius d'avançament mandibular augmenten l'espai a la VAS i constitueixen una alternativa vàlida en el tractament del SAHS. Generalment, s'indiquen per casos no greus i en pacients que no toleren o rebutjen la CPAP.

És imprescindible que els esmentats dispositius siguin indicats, projectats i adaptats per odontòlegs amb suficient formació i experiència, i és molt recomenable que estiguin coordinats amb les Unitats de Son especialitzades.

IV.6. SAHS I MÚSCUL.

La major part dels estudis sobre múscul esquelètic que s'han realitzat en pacients amb SAHS s'han centrat en els músculs de la via aèria superior (MVAS). Aquesta és l'única regió del tracte respiratori que no es troba envoltada per una estructura rígida de teixit cartilaginós. Per contra, està constituïda per un complex conjunt d'estructures anatòmiques entre les que destaquen diversos M. estriats i teixits tous. Per una part, la seva funció respiratòria necessita que la VAS romangui oberta i permeable al pas de l'aire. D'altra banda, les seves funcions no respiratòries, com són la vocalització, la deglució, la succió, etc..., requereixen que hi hagi canvis continuats en el tamany de la VAS (Horner 2007).

A nivell muscular, el to de la VAS ve donat per l'equilibri que hi ha entre els M. dilatadors i els M. constrictors de la faringe. El M. genioglòs és el principal M. dilatador de la faringe i és el MVAS que més s'ha estudiat en pacients amb SAHS.

IV.6.1. Els músculs estriats durant el son.

El son té una funció reparadora sobre del sistema nerviós central i a nivell muscular, tal i com ho demostra el fet que la privació de son deteriora la funció muscular diürna, tant a nivell del múscul perifèric com als MMRR (Chen 1989). Aquesta funció restauradora sobre els músculs vindria propiciada pel repòs muscular en si i, probablement, per la disminució en el metabolisme basal global, en la ventilació pulmonar, en la tensió arterial i en la despesa cardíaca observades durant la nit.

A l'igual que afecta altres vies metabòliques, el son disminueix l'activitat de diferents enzims responsables del metabolisme aeròbic muscular.

L'activitat electromiogràfica dels M. intercostals es troba força disminuïda durant el son, sobretot durant la fase de moviments oculars ràpids (*fase REM*, de l'anglès *rapid eye movements*). De fet, l'activitat dels M. intercostals és la responsable del 60% del volum corrent (*volum Tida*) a les fases no REM del son (Félez 2002). En canvi, a la fase REM el principal M. responsable de mantenir el volum corrent és el diafragma.

Ja s'ha comentat que durant el son es produeix una disminució del to muscular esquelètic. Aquesta hipotonia afecta a tots els M. estriats de l'organisme, des dels M. de les extremitats fins als MMRR. Òbviament, també es veuen afectats els M. dilatadors de la faringe.

A més dels importants canvis en el to muscular de la faringe, quan dormim hi ha modificacions en les respostes reflexes locals, que condueixen a un estretament de la VAS i a una resistència respiratòria augmentada. Aquesta última contribueix de manera decisiva a la hipoventilació que s'observa normalment en individus sans durant el son, i que suposa un increment de 3 a 5 mmHg en la PaCO₂ arterial respecte a les xifres basals (subjecte despert). Els estudis amb resonància magnètica han demostrat un increment de les parts toves que envolten la VAS en pacients amb SAHS, el que condiciona una VAS més estreta que la dels individus sans, la qual cosa els predisposa, durant el son, a una limitació del flux inspiratori (hipopnea) o a la seva interrupció completa (apnea) (Ryan 2005).

IV.6.2. Els músculs estriats a la SAHS.

Nombrosos treballs han estudiat la funció i el control nerviós dels músculs de la via aèria. Només uns pocs han avaluat la seva estructura. En concret, s'han descrit les característiques morfològiques del M. genioglòs, el M. de l'úvula, el M. palatofaringi (Edström 1992) i els M. constrictors de la faringe (Ferini-Strambi 1998). Aquests estudis han mostrat un desplaçament cap a les fibres de tipus II en les proporcions fibril·lars, un increment en l'activitat enzimàtica glucolítica i una fatigabilitat augmentada en els MVAS dels pacients amb SAHS (Series 1996, Carrera 1999). Aquestes anomalies estructurals i funcionals es normalitzen completament després de fer tractament amb CPAP.

Menys investigacions encara han avaluat les característiques dels músculs perifèrics en malalts amb SAHS. El grup de l'Hospital Universitari de Son Dureta (Saulea 2003) va estudiar l'estructura i l'activitat enzimàtica del M. quàdriceps en pacients amb SAHS i en subjectes de edat i activitat física equiparables. Els malalts amb SAHS presentaven unes fibres de tamany superior que els individus sans,

particularment les fibres de tipus II. A més, el contingut total de proteïnes musculars era més gran, i l'activitat enzimàtica (glucolítica i oxidativa) era major en els M. dels pacients amb SAHS. Estudis funcionals han mostrat que el metabolisme energètic muscular es troba afectat en malalts amb SAHS, tant a nivell aeròbic com anaeròbic (Vanuxem 1997).

Per acabar, hi ha diferents estudis sobre la funció dels músculs respiratoris a la SAHS, però no ens consten treballs d'altres grups d'investigació que hagin avaluat l'estructura dels mateixos.

Durant les apnees obstructives, els MMRR realitzen esforços repetits i progressius fins que es restaura la permeabilitat de la VAS. En aquesta situació, els MMRR estan sotmesos a càrregues potencialment esgotadores, com suggereix l'elevat índex tensió-temps del diafragma (TTdi) que s'assoleix abans de finalitzar l'apnea (Vincken 1987, Wilcox 1990). Tanmateix, el treball dels MMRR durant les apnees es realitza sota condicions adverses, com són la hipoxèmia, la hipercàpnia i la disminució de la despesa cardíaca. A més, a la SAHS es produeix una interrupció i una desestructuració de l'arquitectura del son, que pot contribuir a empitjorar la funció dels MMRR. El treball dut a terme pels MMRR és més intens durant les fases no REM del son. S'ha vist que a mesura que avança la nit s'incrementa l'esforç inspiratori i augmenta la durada de les apnees (Montserrat 1996).

D'altre banda, hom podria especular que la SAHS té un "efecte entrenament" sobre els MMRR (Félez 2002). Els pacients amb SAHS presenten inspiracions repetides contra resistència, que representen un model molt similar a l'utilitzat en els programes d'entrenament dels MMRR en malalts amb MPOC. I aquests programes han demostrat la seva eficàcia en incrementar la força i la resistència dels MMRR.

Montserrat *et al.* (Montserrat 1997) descriuen com els pacients amb SAHS no presenten fatiga diafragmàtica durant la nit. És sorprenent observar com els MMRR són capaços de mantenir, o fins i tot augmentar, la seva funció muscular durant la nit, malgrat realitzen un treball intens. Sembla ser que després de finalitzar l'apnea es recupera la PaO₂, l'aport d'oxigen al múscul, la producció d'ATP i, per tant, la capacitat per a generar força durant la nova apnea.

Recapitulant, en els pacients amb SAHS els MMRR realitzen un intens treball durant la nit sense mostrar signes de fatiga. Aquest treball és més important en els individus més joves, al final de la nit, i a les fases no REM del son.

El nostre grup d'investigació ha avaluat la funció muscular respiratòria diürna en malalts amb SAHS abans i després del tractament amb CPAP (Arán 1999). Els 12 pacients amb SAHS que vàrem estudiar presentaven, durant el dia, una resistència a la fatiga dels MMRR notablement disminuïda en comparació amb els subjectes control. En canvi, la força dels MMRR es trobava pràcticament conservada, amb una lleugera tendència a disminuir. L'aplicació nocturna de CPAP durant dos mesos va corregir el déficit de resistència muscular respiratòria d'aquests malalts. Cal destacar que els pacients que van millorar més amb el tractament amb CPAP van ser aquells que tenien una activitat nocturna més intensa a nivell dels MMRR.

En resum, en pacients amb SAHS s'ha descrit una alta proporció de fibres musculars fatigables als M. dilatadors de la faringe, responsables de mantenir oberta la VAS. També s'ha demostrat un deteriorament en la funció diürna dels MMRR en aquests malalts. El tractament amb CPAP té efectes beneficiosos sobre els MVAS i els MMRR.

Si bé la funció dels MMRR (força i resistència) a la SAHS ha estat repetidament avaluada per diversos autors, no succeeix el mateix amb la seva estructura. No tenim evidència d'estudis realitzats per altres equips d'investigació sobre la morfometria dels M. intercostals externs en humans amb SAHS.

IV.7. SAHS I INFLAMACIÓ.

Les primeres investigacions fetes en malalts amb SAHS van centrar-se en els canvis que hi havia a nivell de les vies aèries superiors i, més concretament, a la faringe. Més tard, l'interès s'ha anat desplaçant cap a les repercussions sistèmiques de la malaltia. Avaluarem, doncs, el procés inflamatori a la SAHS sota aquestes dues vessants, la local i la sistèmica.

IV.7.1. Resposta inflamatòria a nivell de la via aèria superior en els malalts amb SAHS.

Hem vist com els M. dilatadors de la faringe tenien una importància crítica per a mantenir oberta la via aèria superior. A la SAHS s'ha demostrat que es trenca l'equilibri entre les forces que dilaten la faringe i les que tendeixen a ocluir-la, com són les pressions negatives de succió (Remmers 1978). Sota aquestes condicions, els teixits de la VAS pateixen traumatismes mecànics repetits, secundaris als grans canvis de pressió que es produeixen a la faringe i a les violentes contraccions musculars en front d'una VAS tancada. Aquests traumatismes mecànics poden causar danys estructurals tant a nivell de la mucosa com en els músculs i nervis de la faringe.

S'han descrit canvis estructurals, així com infiltració per cèl.lules inflamatòries i edema a la mucosa de la VAS en pacients amb SAHS (Woodson 1991, Sekosan 1996, Paulsen 2002). A nivell de l'úvula, les cèl.lules predominantment identificades han estat les cèl.lules T. Més recentment s'ha avaluat la inflamació a les capes més profundes de la paret de la faringe.

L'equip de Boyd (Boyd 2004) va estudiar la presència de cèl.lules inflamatòries als músculs de la VAS de malalts amb SAHS, en un treball que mereix un comentari més detallat per part nostra. Analitzant mostres obtingudes de cirurgia del paladar van comparar la resposta inflamatòria que hi havia a nivell epitelial i muscular, en pacients amb SAHS i en individus control no roncadors. Van avaluar per immunohistoquímica 5 tipus de marcadors de cèl.lules inflamatòries. Tant a nivell de la mucosa de la VAS com a nivell muscular, hi havia més cèl.lules inflamatòries en els pacients amb SAHS que en els subjectes control, si bé la resposta inflamatòria va ser superior a la mucosa que al

múscul. Pel que fa als subtipus cel.lulars, hi havia un nombre incrementat de cèl.lules T en ambdues localitzacions, encara que el tipus predominant van ser els limfòcits CD8+ a la mucosa i els CD4+ al múscul. A més, les cèl.lules T presents es trobaven activades (CD25+). Quant als monòcits/macròfags, no es va veure que haguessin augmentat a la mucosa de la VAS. A nivell muscular van observar una tendència a l'increment de macròfags, però les diferències no assolien significació estadística. Val a dir que les cèl.lules inflamatòries identificades al múscul es trobaven aïllades i dispersades per tot el teixit, sense formar infiltrats.

IV.7.2. Resposta inflamatòria sistèmica a la SAHS.

Hi ha evidències que els pacients amb SAHS tenen uns nivells sèrics augmentats de Proteïna C Reactiva (PCR), citocines proinflamatòries, molècules d'adhesió cel.lular i marcadors d'estrès oxidatiu.

IV.7.2.1. La PCR a la SAHS.

La SAHS es considera un factor de risc cardiovascular independent, havent-se associat a patologia cardio i cerebrovascular (Peppard 2000). La PCR és un important marcador sèric de la inflamació, que es sintetitza al fetge i que és regulada per les citocines. Els estudis epidemiològics mostren que uns nivells augmentats de PCR són un fort predictor de risc cardiovascular (Danesh 2000), havent-se vinculat a l'arteriosclerosi i a la malaltia coronària.

Inicialment es va descriure que els malalts amb SAHS presentaven una concentració plasmàtica de PCR més alta que els individus sans, la qual cosa suggeria que el procés inflamatori associat a la SAHS podria contribuir a la morbiditat cardiovascular en aquests malalts (Shamsuzzaman 2002). A més a més, els nivells de PCR tenien una relació directa amb la gravetat de la malaltia, i el tractament amb CPAP abaixava la concentració en sèrum de PCR (Yokoe 2003).

Estudis posteriors no han trobat una associació tan clara entre la SAHS i els nivells de PCR. En pacients amb SAHS amb un BMI més baix, no es va demostrar una

relació directa entre la SAHS i la PCR (Guilleminault 2004). El darrer treball publicat sobre el tema (Taheri 2007) va incloure 907 individus adults, i no va mostrar cap associació entre els nivells de PCR i els trastorns respiratoris durant el son, després de controlar possibles factors de confusió, com eren l'edat, el sexe i el BMI.

Les discrepàncies entre les diverses investigacions podrien explicar-se perquè es van incloure pacients amb SAHS de diferent gravetat i BMI. El que sembla repetir-se en tots els estudis és una evident correlació entre els nivells de PCR i l'obesitat.

IV.7.2.2. Les citocines a la SAHS.

Entre les dades clíniques i fisiopatològiques més rellevants a la SAHS es troben les alteracions del son, i més concretament, la hipersòmnia diürna. Les citocines proinflamatòries TNF i IL-6 semblen implicades en la regulació del son, tant en animals com en humans. Una producció endògena augmentada d'IL-6 s'ha associat amb somnolència excessiva i fatigabilitat (Papanicolaou 1996).

Els nivells plasmàtics de TNF i IL-6 es troben elevats en els malalts amb SAHS (Entzian 1996, Vgontzas 2000). A més, la inactivació del TNF secundària a l'administració d'un antagonista del propi TNF disminueix la hipersòmnia en els pacients amb SAHS (Vgontzas 2004).

S'ha comentat anteriorment el paper de la hipòxia a la SAHS. Hi ha estudis experimentals que demostren que la hipòxia estimula l'alliberament de IL-6. A més, els pacients amb SAHS i amb la síndrome d'hipoventilació-obesitat presenten nivells elevats d'IL-6 (Roytblat 2000).

De tots els estudis que han avaluat mediadors de la inflamació, el que més pacients amb SAHS ha inclòs fins ara (Ryan 2006), va demostrar relacions significatives entre gens dependents del NF-KB, el TNF i la IL-8, la saturació d'oxigen durant el son i la presència de somnolència. Els nivells plasmàtics de TNF i IL-8 eren més alts en els pacients amb SAHS que en els controls. El tractament amb CPAP va baixar els nivells de TNF. Curiosament, altres citocines avaluades en aquest estudi, IL-1, IL-6, IL-10, i IL-12, no van mostrar diferències entre els malalts amb SAHS i els individus control.

En l'apartat de Discussió es detallen més aspectes relacionats amb les citocines estudiades en la present tesi doctoral.

IV.7.2.3. Les molècules d'adhesió cel.lular a la SAHS.

El TNF i la IL-6 han estat implicats en la patogènia de l'arteriosclerosi. Ja hem comentat que els pacients amb SAHS presenten un risc incrementat de patir malalties cardiovasculars (Marín 2005, Nieto 2000, Peker 2002). Recentment, s'ha descrit com els malalts amb SAHS pateixen arteriosclerosi precoçment. Hi ha indicis, doncs, d'una relació entre la SAHS i l'arteriosclerosi. L'adhesió dels leucòcits circulants a les cèl.lules endotelials constitueix un dels estadis inicials en la fisiopatologia de l'arteriosclerosi (Ross 1993), i els mediadors responsables d'aquest procés semblen ser les molècules d'adhesió.

Les molècules d'adhesió cel.lular són proteïnes de la membrana cel.lular que actuen com a mediadores en les interaccions entre cèl.lules, i entre aquestes i la matriu extracel.lular (Brasó 2003). Les molècules d'adhesió, a l'interactuar amb els seus lligands, estableixen la unió entre dues cèl.lules i transmeten senyals al medi intracel.lular, de forma similar a un receptor. Moltes tenen una estructura glucoproteica, i s'agrupen en tres famílies: les *selectines*, les *integrines* i la *superfamília de les immunoglobulines*. S'han descrit nivells elevats de molècules d'adhesió, com són la molècula d'adhesió intercel.lular-1 (ICAM-1), la molècula d'adhesió cel.lular vascular-1 (VCAM-1), i la E-selectina, en pacients amb SAHS (Chin 2000, El Solh 2002).

Més recentment, s'han confirmat els nivells sèrics augmentats de TNF, IL-6 i d'ICAM en malalts amb SAHS i la seva relació amb la gravetat de la malaltia, però no amb la presència o no d'hipersòmia (De la Peña 2007).

IV.7.2.4. Les cèl.lules inflamàtoies a la SAHS.

Pel que fa a la resposta cel.lular inflamàtoia en pacients amb SAHS, s'ha suggerit que les fonts de TNF poden ser tant els monòcits com les cèl.lules T (Minoguchi 2004, Dyugovskaya 2003). L'equip de Yamauchi (Yamauchi 2006) va

demostrar que existia una activació del NF-kB en els monòcits circulants de pacients amb SAHS, i que la CPAP era capaç de revertir aquesta activació. Ja hem comentat abans que el NF-kB és un factor de transcripció clau en la cascada inflamatòria. Entre d'altres, els gens del TNF i de la IL-8 depenen del NF-kB. Més encara, les vies inflamatòries que depenen del NF-kB s'activen selectivament per la hipòxia intermitent i la reoxigenació posterior, segons indica un estudi realitzat amb cultius cel·lulars (Ryan 2005).

S'ha establert que la SAHS és una entitat caracteritzada per un increment en l'estrès oxidatiu i un estat d'activació de les cèl·lules inflamatòries (Lavie 2003). Els monòcits i els limfòcits T $\gamma\delta$ de pacients amb SAHS expressen, doncs, un fenotip activat, que els permet una major adhesió a la paret vascular, la formació de radicals lliures i una citotoxicitat ben definida en front de les cèl·lules endotelials (Dyugovskaya 2003). Posteriorment, s'ha demostrat que els limfòcits T CD8+ de malalts amb SAHS també expressen un fenotip activat i una citotoxicitat *in vitro* augmentada en front de diferents cèl·lules diana (Dyugovskaya 2005). El tractament amb CPAP disminueix significativament la citotoxicitat de les cèl·lules T CD8+.

IV.7.3. Possibles mecanismes implicats en el procés inflamatori a la SAHS.

Més d'un 60 % dels malalts amb SAHS són obesos (Anstead 1999). Així mateix, l'obesitat per si sola és considerada un estat inflamatori. No pot constituir, doncs, una font de confusió quan analitzem la resposta inflamatòria a la SAHS? La major part de les investigacions sobre el tema han confirmat els nivells augmentats de mediadors de la inflamació en pacients amb SAHS, quan són comparats amb controls amb BMI i edat equiparables. En aquest aspecte, com ja hem comentat més amunt, s'han descrit elevacions en múltiples molècules: PCR, IL-6, TNF, IL-1 β , leptina, espècies d'oxigen reactives (ROS), ICAM-1, VCAM-1, i d'altres (Hatipoglu 2003).

Hi ha estudis que indiquen que les concentracions de leptina són més altes en els malalts obesos amb SAHS que en subjectes obesos sense trastorns respiratoris durant el son. S'ha suggerit que la leptina podria ser una substància inductora de la inflamació (van Dielen 2001). Hom sap que, apart del seu paper en la ingesta alimentària i les seves funcions metabòliques i endocrines, la leptina és capaç de

regular la immunitat innata i adquirida, la resposta inflamatòria i la hematopoesi (Fantuzzi 2000). La leptina guarda similitud amb algunes citocines com la IL-6 i la IL-11 (Bruno 2005). A més, afecta la producció de citocines i l'activació dels monòcits/macròfags, i regula el nombre i l'activació dels limfòcits T. Per acabar, la producció de leptina es troba augmentada durant la infecció i la inflamació.

La hipòxia intermitent és una de les principals característiques de la SAHS, i comprèn múltiples cicles d'hipòxia i reoxigenació. Alguns estudis indiquen que aquests cicles, ja sigui directament o mitjançant les citocines proinflamatòries, activen una sèrie de cèl.lules, com són les endotelials i els leucòcits, propagant les respostes inflamatòries.

És ben coneguda la hiperactivitat simpàtica a la SAHS. S'ha suggerit que la resposta inadequada a la hipòxia per part dels quimiorceptors que ha estat demostrada en malalts amb SAHS, podria conduir a una resposta simpàtica excessiva, que posaria en marxa la cascada de la inflamació (Yun 2004). Novament, la CPAP ha mostrat uns efectes beneficiosos sobre la funció del sistema nerviós simpàtic (i la tensió arterial) en pacients amb SAHS, independentment del BMI.

En resum, s'ha descrit un component inflamatori (a nivell molecular i cel.lular) en els pacients amb SAHS, tant a nivell de la VAS com a nivell sistèmic. El tractament amb CPAP sembla tenir un efecte beneficiós sobre alguns marcadors de la inflamació en aquest tipus de malalts.

V. LA MALATIA PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÒNICA (MPOC).

Queda lluny dels objectius d'aquest treball una revisió exhaustiva de la MPOC. El lector trobarà múltiples documents i guies de les diferents societats científiques que tracten abastament aquesta malaltia. Tanmateix, el nostre grup d'investigació ha presentat diferents tesis doctorals on es feia una posta al dia actualitzada dels coneixements vigents sobre la MPOC.

En les pròximes pàgines només fem unes pincellades sobre alguns conceptes fonamentals de la MPOC i alguns aspectes que ens assemblen més novedosos o més adients per a la comprensió del present treball. Es tracta amb més detall el capítol que correspon als músculs i la MPOC.

Des d'un punt de vista epidemiològic i econòmic la MPOC suposa una enorme càrrega a nivell estatal i mundial. La prevalença de la MPOC a la població adulta és del 9% a Espanya (Sobradillo 1999) i oscil·la entre un 8 i un 20% a l'Amèrica Llatina. La MPOC representa la quarta causa de mortalitat a Espanya i al món. S'estima que cap a l'any 2020 passarà a ser la tercera causa de mort a nivell mundial. Cada any moren a l'Estat espanyol més de 18.000 persones per la MPOC (Soriano 2007).

V.1. ASPECTES CLÍNICS DE LA MPOC.

V.1.1. Concepte de MPOC.

A continuació exposem dues definicions de la MPOC, ambdues publicades l'any 2008: la una corresponent a les últimes guies realitzades per la Sociedad Española de Patología del Aparato Respiratorio (SEPAR) i l'altre, d'àmbit mundial, la que es troba a la darrera actualització de la GOLD ("Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, GOLD").

A la "Guía Clínica SEPAR-ALAT de diagnóstico y tratamiento de la EPOC" es defineix la MPOC com una malaltia que es caracteritza per la presència d'obstrucció crònica i poc reversible al flux aeri, associada a una reacció inflamatòria anòmala

principalment en front del fum del tabac, malgrat que només una quarta part dels fumadors acaba desenvolupant MPOC (Peces-Barba 2008).

Val a dir que la inflamació crònica que s'associa a la MPOC cursa amb remodelatge que afecta a les vies aèries, el parènquima pulmonar i les artèries pulmonars (Peces-Barba 2008).

L'any 2001 es va publicar l'informe GOLD, en el context de la Iniciativa Global per a la MPOC (anomenada "GOLD", en anglès, veure més amunt), amb la finalitat de millorar la prevenció i el tractament de la MPOC amb una estratègia coordinada a nivell mundial (www.goldcopd.org). Des d'aleshores un Comité Científic s'ha encarregat de l'actualització permanent de l'esmentat document a mesura que apareixen noves evidències científiques.

Segons la definició de la GOLD, "la MPOC és una malaltia prevenible i tractable, amb afectació sistèmica i extrapulmonar que pot contribuir a la gravetat en alguns pacients. El component pulmonar es caracteritza per una limitació al flux aeri que no és completament reversible. Generalment, la limitació al flux aeri és progressiva i va associada a una resposta pulmonar anòmala en front de partícules o gasos nocius".

Dos aspectes remarcables d'aquestes definicions són, en primer lloc, que es fa èmfasi en el component inflamatori de la malaltia i, en segon lloc, que la MPOC es considera una entitat sistèmica, que no afecta només l'aparell respiratori.

V.1.2. Aproximació diagnòstica i maneig de la MPOC.

V.1.2.1. Avaluació del malalt amb MPOC.

El diagnòstic de MPOC s'ha de considerar en qualsevol pacient que presenti dispnea, tos crònica i producció d'esput, i/o que tingui història prèvia d'exposició als factors de risc de la malaltia, sobretot al fum del tabac.

L'obstrucció al flux aeri es defineix mitjançant l'espirometria, quan el quocient entre el volum espiratori forçat en el primer segon i la capacitat vital forçada

(FEV₁/FVC) després de broncodilatació és menor de 0,7 (o per sota del límit inferior de la normalitat en persones de més de 60 anys).

A efectes pràctics i pedagògics, la GOLD proposa una classificació espiromètrica de la gravetat de la MPOC que és utilitzada arreu del món. A la taula V.1. es poden veure els quatre estadis de gravetat de la malaltia.

El valor del FEV₁ s'ha considerat que era el millor indicador de la gravetat de l'obstrucció al flux aeri i s'utilitza com a primer paràmetre per a classificar la malaltia (GOLD). Però el caràcter heterogeni i sistèmic de la MPOC aconsella tenir en compte altres variables apart del FEV₁ a l'hora de fer la valoració clínica dels pacients, com són l'intercanvi de gasos, els volums pulmonars, la percepció dels símptomes, la capacitat de fer exercici, la freqüència de les exacerbacions, i la presència d'alteracions nutricionals (pèrdua ponderal). En aquest sentit, fa uns anys es va descriure un índex combinat anomenat BODE (de l'anglès, "Body-Mass Index, Airflow Obstruction, Dyspnea, and Exercise Capacity Index") que ha demostrat la seva utilitat pronòstica, doncs sembla ser superior al FEV₁ en la predicció del risc de mort per qualsevol causa i de causa respiratòria en els malalts amb MPOC (Celli 2004). A més a més, el BODE ha mostrat ser útil com a predictor d'hospitalització en pacients amb MPOC i com a índex per avaluar diferents mesures terapèutiques que poden modificar el curs de la malaltia. L'avantatge d'un índex multidimensional com el BODE és que permet fer un seguiment de l'activitat de la MPOC i de la resposta al tractament, incloent uns marcadors no pulmonars que reflecteixen l'impacte que tenen els factors sistèmics en el pronòstic de la MPOC (Mahler 2007).

Taula V.1.

Classificació espiromètrica de la gravetat de la MPOC (FEV₁ post broncodilatador)	
Estadi I: Lleu	FEV ₁ / FVC < 0,70 FEV ₁ ≥ 80% ref.
Estadi II: Moderat	FEV ₁ / FVC < 0,70 50% ≤ FEV ₁ < 80% ref.
Estadi III: Greu	FEV ₁ / FVC < 0,70 30% ≤ FEV ₁ < 50% ref.
Estadi IV: Molt greu	FEV ₁ / FVC < 0,70 FEV ₁ < 30% ref., <i>o bé</i> FEV ₁ < 50% ref. més insuficiència respiratòria

FEV₁: volum espirat màxim en el primer segon

ref: valor de referència

FVC: capacitat vital forçada

Insuficiència respiratòria: pressió parcial arterial d'oxigen (PaO₂) inferior a 60 mmHg (8.0 kPa) amb o sense pressió parcial arterial de diòxid de carboni (PaCO₂) superior a 50 mmHg (6.7 kPa), respirant aire ambient i a nivell del mar.

(Taula trenta de la iniciativa GOLD actualitzada a desembre de 2010.)

V.1.2.2. Principals novetats en el maneig de la MPOC.

En la guia GOLD s'insisteix en la prevenció i detecció precoç de la malaltia, incidint en els factors de risc. Respecte al primer punt es fa esment a la importància en la prevenció de la exposició al fum del tabac, i el suport i el tractament que cal per ajudar als pacients a deixar de fumar. Tanmateix es fa referència al control de la pol·lució ambiental.

Un altre aspecte en el que s'està incidint molt a la literatura són les exacerbacions de la malaltia. Aquestes es defineixen com "un canvi agut en la situació clínica basal del malalt, més enllà de la variabilitat diària, que cursa amb augment de la dispnea, increment de l'expectoració i augment de la purulència de l'esput, o qualsevol combinació d'aquests tres símptomes, i que necessita un canvi terapèutic" (Peces-Barba 2008). La importància de les exacerbacions radica en l'elevada taxa de mortalitat que presenten, i la necessitat d'ingrés hospitalari i de canvis en el tractament dels pacients, amb el considerable increment en la despesa econòmica sanitària que suposen. Més recentment, s'ha descrit una relació entre el nombre d'exacerbacions i la davallada de la funció pulmonar (Donaldson 2002, Anzueto 2010, Miravittles 2010), així com un augment dels mediadors inflamatoris durant les aguditzacions de la MPOC, tant a nivell local (Bhowmik 2000) com sistèmic (Pinto-Plata 2007). Donats els efectes perjudicials sobre la història natural de la malaltia i sobre la supervivència que presenten les exacerbacions de la MPOC, darrerament s'estan buscant mesures per a prevenir-les, havent-se identificat uns factors de risc per patir una agudització de la MPOC, que en ser controlats permetrien millorar el pronòstic i la qualitat de vida dels malalts (Taula V.2.).

Respecte al tractament de la MPOC, en els darrers anys s'han intentat trobar mesures que vagin més enllà del control simptomàtic de la malaltia. Més concretament, s'han introduït tractaments amb la finalitat de modificar la història natural de la MPOC. Així, conjuntament amb mesures clàssiques amb coneguts efectes sobre la reducció de la mortalitat, com són l'oxigenoteràpia crònica domiciliària i l'abstenció de l'hàbit tabàquic, darrerament s'han introduït nous fàrmacs amb la capacitat de modificar el curs de la malaltia: els betamimètics i els anticolinèrgics d'acció prolongada. Així doncs, els broncodilatadors d'acció prolongada (salmeterol, formoterol i bromur de tiotropi) s'han d'utilitzar en tots els malalts que necessiten tractament de manera regular,

perquè redueixen tant els símptomes com el nombre d'exacerbacions, i milloren la qualitat de vida (Boyd 1997, Aalbers 2002, O'Donnell 2004). En un darrer estudi sembla demostrar-se la superioritat del tiotropi sobre el salmeterol en quant a la prevenció de les exacerbacions de la MPOC (Vogelmeier 2011).

El tractament amb glucocorticoides inhalats en pacients amb MPOC moderada i greu redueix el nombre d'exacerbacions, produeix un lleu increment en el FEV₁ i millora la qualitat de vida (Pauwels 1999, Burge 2000). Malauradament, un estudi més recent, multicèntric i controlat, no ha demostrat que tinguin efectes sobre la supervivència (Calverley 2007). Avui dia es recomana el seu ús en aquells malalts amb MPOC greu (FEV₁ inferior al 50% del valor teòric) i que han presentat aguditzacions freqüents de la seva malaltia (Anguera 2009). En aquest grup de malalts que han presentat exacerbacions de la seva malaltia s'ha introduït recentment un nou fàrmac, el roflumilast, que pertany als inhibidors de la fosfodiesterasa-4, i que aconsegueix disminuir el nombre de descompensacions agudes i millorar la funció pulmonar en pacients amb MPOC (Rabe 2005, Fabbri 2009).

Respecte a les mesures no farmacològiques proposades pel control de la malaltia és ben sabut que l'activitat i l'exercici físic diari són beneficiosos pels malalts amb MPOC. Els programes de rehabilitació milloren la dispnea, la capacitat d'exercici i la qualitat de vida relacionada amb la salut dels pacients amb MPOC. La rehabilitació respiratòria disminueix la utilització dels serveis sanitaris i els ingressos hospitalaris, ha demostrat ser cost-efectiva i millora l'índex BODE. És probable que una part d'aquests beneficis sigui atribuïble als seus efectes sobre l'estructura i la funció muscular.

Finalment, és ben conegut que durant les aguditzacions de la malaltia la ventilació no invasiva disminueix significativament la mortalitat, evita les complicacions de la intubació endotraqueal i escurça el temps d'estada hospitalària (Brochard 1995, Plant 2000). La modalitat tipus BiPAP (de l'anglès "Bilevel Positive Airway Pressure") sembla ser la forma més efectiva de ventilació. És remarcable, en el context de l'actual tesi doctoral, l'efecte beneficiós que té la ventilació no invasiva sobre la funció dels músculs respiratoris, prevenint la fatiga muscular. En un altre capítol es tracta amb més profunditat aquest tema.

En resum, i com ja s'ha comentat més amunt, la MPOC és una malaltia complexa amb manifestacions pulmonars i extrapulmonars. En el futur es farà necessària una millor comprensió de les múltiples dimensions de la malaltia i de les seves relacions amb altres entitats clíniques (comorbilitats). Una aproximació multifactorial a nivell clínic, cel.lular i molecular probablement ens permetrà optimitzar el maneig terapèutic de la MPOC. En aquest sentit s'han descrit diferents fenotips de la malaltia i nous biomarcadors. Així mateix, els nous avenços científics en el camp de les xarxes complexes i de la biologia de sistemes semblen oferir noves oportunitats per un abordatge multidisciplinari i integral de la MPOC (Agustí 2011).

Taula V.2.

Estratègies per la prevenció d'exacerbacions de la MPOC.	
Eficàcia provada	Deixar de fumar LABAs: salmeterol, formoterol Tiotropi Teràpia combinada: LABA + ICS Vacuna antigripal Vacuna antipneumocòccica Rehabilitació Exercici físic Plans d'automaneig Cirurgia de reducció pulmonar (pacients seleccionats)
Eficàcia qüestionada	Teofilines Antibiòtics profilàctics (pacients seleccionats) Immunomoduladors Agents mucolítics Antioxidants

LABA: Agonistes-Beta de llarga durada per via inhalatòria

ICS: Corticosteroides inhalats

(Taula trenta de Miravittles 2010).

V.2. RELACIÓ ENTRE INFLAMACIÓ I FUNCIO MUSCULAR A LA MPOC.

Una vegada exposats els fonaments sobre l'estructura i funció musculars i havent tractat els aspectes principals del fenomen inflamatori, així com una petita ressenya sobre la MPOC, intentarem exposar els vincles que poden existir entre ells. En primer lloc estudiarem el procés inflamatori a nivell muscular, per després centrar-nos en la relació que sembla haver entre la inflamació sistèmica i la disfunció muscular en els pacients amb MPOC.

V.2.1. Inflamació i múscul.

Els processos inflamatoris a nivell muscular han estat abastament estudiats en diferents models: lesió induïda per l'exercici, lesió mecànica, lesions provocades per endotoxines bacterianes (infecció), malalties autoimmunes (polimiositis i dermatomiositis)... En totes aquestes situacions, la cèl.lula muscular ha passat de ser considerada com un subjecte estrictament passiu en el procés inflamatori mediat per cèl.lules inflamatòries a tenir un protagonisme destacat, com més endavant exposem.

V.2.1.1. La cèl.lula muscular té capacitat immune.

El múscul és un teixit diana en la lesió mediada immunològicament en diverses malalties musculars i sistèmiques. Clàssicament es discutien els efectes del sistema immune (sobretot les seves cèl.lules) sobre altres cèl.lules, teixits i òrgans. En els darrers anys s'han anat coneixent les capacitats immunològiques dels teixits que no pertanyen al sistema immunitari pròpiament dit. Sota determinades condicions, les fibres musculars tenen la capacitat d'expressar i de respondre a nombroses molècules de superfície, citocines i quimiocines (Nagaraju 2001). Així mateix, les cèl.lules musculars poden processar i presentar antígens a les cèl.lules immunes.

V.2.1.2. La cèl.lula muscular pot actuar com a cèl.lula presentadora d'antígens.

Ja hem comentat com la presentació d'antígens és un pas obligat en el reconeixement dels antígens proteics per les cèl.lules T. Perquè les cèl.lules T responguin a un antigen, el pèptid antigènic ha de ser processat i presentat a la superfície d'una cèl.lula presentadora d'antígens (CPA) en el context de les molècules del complex major d'histocompatibilitat (MHC). Aquestes són glucoproteïnes de membrana que tenen la capacitat d'unir-se a pèptids i d'actuar com a sistemes de transport capaços de portar fragments peptídics cap a la superfície de la cèl.lula, on poden interactuar amb les cèl.lules T.

Les *CPA professionals* són els monòcits/macròfags, les cèl.lules dendrítiques i els limfòcits B. Altres cèl.lules que poden actuar com a CPA en certes situacions són les cèl.lules endotelials, les cèl.lules epitelials, els miòcits cardíacs fetals i les fibres musculars esquelètiques.

En el teixit muscular les CPA professionals són escasses. Generalment les CPA professionals són reclutades cap al múscul en resposta a una lesió (Austyn 1994, Pardoll 1995).

Entre les cèl.lules que poden actuar com a CPA facultatives sota estímuls inflamatoris hi ha les cèl.lules endotelials. Les cèl.lules endotelials activades són capaces d'expressar antígens de superfície semblants als de les cèl.lules fagocítiques mononuclears. En les biòpsies de malalts amb miositis s'han trobat evidències de que les cèl.lules endotelials dels vasos sanguinis i capil.lars presenten molècules del MHC i coestimuladores, la qual cosa podria indicar el seu paper en el processament i presentació de l'antigen durant la inflamació muscular.

És possible que les cèl.lules T rebin la primera senyal per activar-se de pèptids del MHC que serien expressats per les cèl.lules musculars o endotelials. La segona i definitiva senyal vindria donada per les CPA hematopoètiques que serien reclutades durant el procés inflamatori (miositis) (Nagaraju 2001).

V.2.1.3. Fibra muscular i molècules del MHC de classe II.

La major part de les cèl.lules epitelials, vasculars i mesenquimals no expressen molècules del MHC de classe II. Durant la inflamació molts tipus cel.lulars són induïts a expressar petites quantitats de molècules del MHC de classe II com a resultat de la producció local de citocines proinflamatòries. Les cèl.lules musculars humanes en cultiu no estimulades, tampoc expressen molècules del MHC de classe II. Però, al ser sotmeses a l'estímul de citocines proinflamatòries com l'IFN- γ , el TNF i la IL-1, les fibres musculars expressen molècules del MHC de classe II. *In vivo*, s'ha vist l'expressió de molècules del MHC de classe II en biòpsies musculars de pacients amb miositis.

V.2.1.4 Fibra muscular i molècules del MHC de classe I.

Les molècules del MHC de classe I són glucoproteïnes de membrana que s'expressen a quasi totes les cèl.lules nucleades del cos humà. L'expressió de MHC de classe I en les cèl.lules diana és un requisit per a l'actuació de les cèl.lules T citotòxiques (CD8+) sobre un antigen específic.

Sota condicions de cultiu, els mioblasts humans expressen de manera constitutiva nivells baixos de molècules de classe I (HLA-ABC). La síntesi d'aquestes molècules es veu incrementada per les citocines proinflamatòries IL-1 α , IL-1 β , TNF, i IFN- γ , i per la quimiocina MIP-1 α (Proteïna Inflamatòria del Macròfag 1 alfa). Per contra, el Factor de Creixement Transformant beta (TGF- β) redueix els nivells basals d'expressió de les molècules de classe I.

Les fibres musculars esquelètiques humanes normals no expressen nivells detectables d'antígens de classe I. En canvi, en condicions de malaltia, en les miopaties autoimmunes s'ha descrit que les fibres musculars expressen nivells alts d'antígens de classe I. En models animals, la sobreexpressió del gen de MHC de classe I ha induït dany a la cèl.lula muscular i ha produït miositis.

V.2.1.5. Fibra muscular i molècules d'adhesió.

La interacció entre cèl.lules T i CPA es fa mitjançant múltiples molècules de superfície. Aquestes faciliten l'adhesió i la fixació entre cèl.lules, així com els senyals que els permeten l'intercanvi d'informació. Entre les principals molècules que hi participen cal esmentar les molècules d'adhesió intercel.lular (ICAM-1 i ICAM-3) i els antígens associats a funcions dels leucòcits (LFA-1, LFA-2 i LFA-3).

Però per a l'activació de la cèl.lula T fan falta dos senyals. Primer, el receptor de la cèl.lula T (TCR) ha d'interactuar amb el pèptid de la MHC. I segon, hi ha d'haver una interacció entre els receptors coestimuladors expressats per les CPA i els contrareceptors que són expressats per les cèl.lules T. Entre els receptors coestimuladors destaquen el CD40 i dues molècules de la família B7, la B7.1 i la B7.2. Entre els contrareceptors citarem el CD28, el CTLA4 i el CD40L.

Les fibres musculars humanes no estimulades en cultiu expressen un nivells baixos de LFA-3 però no expressen ICAM-1. Les citocines proinflamatòries TNF i IFN- γ indueixen alts nivells d'expressió de LFA-3 i ICAM-1 en les cèl.lules musculars cultivades. Totes dues molècules, LFA-3 i ICAM-1, afavoreixen la unió de cèl.lules T amb mioblasts *in vitro*. En biòpsies de pacients amb miositis s'ha demostrat la presència de LFA-3 i ICAM-1 a les fibres musculars.

Les cèl.lules musculars humanes en cultiu i no estimulades, expressen CD40. Els nivells d'expressió de CD40 augmenten significativament en presència de TNF i IFN- γ . El lligam de CD40 amb anticossos anti-CD40 produeix un increment de l'expressió de ICAM-1 en les cèl.lules musculars. Les biòpsies de pacients amb miositis mostren la presència de CD40 a les cèl.lules musculars i CD40L als limfòcits T que infiltren el teixit, la qual cosa indicaria els potencials efectes coestimulants entre el CD40 i el CD40L.

V.2.1.6. Citocines i quimiocines a les cèl.lules musculars esquelètiques.

Quasi totes les cèl.lules nucleades del cos poden sintetitzar citocines. Però hi ha diferències segons el tipus de teixit estudiat. Les cèl.lules T sintetitzen la majoria de les citocines involucrades en la resposta immunitària com són nombroses interleucines, els interferons (IFN α , β i γ), el factor estimulant de colònies granulomonocítiques (GM-CSF), el TNF i el TGF- β . Hi ha citocines que són sintetitzades en una gran part dels teixits del cos (IL-1, IL-6, GM-CSF, TNF), mentre d'altres es troben molt més restringides. Entre aquestes darreres cal esmentar la IL-12, que és produïda pels limfòcits B, les cèl.lules dendrítiques i els macròfags; i la IL-2 i la IL-4 que són secretades per les cèl.lules T i els mastòcits.

Les cèl.lules musculars estriades humanes produeixen, de manera constitutiva, nivells baixos de IL-6 i TGF- β . L'expressió d'ambdues molècules augmenta de manera significativa quan són estimulades pel TNF i l'IFN- γ . Els mioblasts expressen MIP-1 α , TNF i IFN- α . En les biòpsies de pacients amb miositis s'ha observat, en les seves fibres musculars, l'expressió de TGF- β , IL-1 α , IL-1 β i TNF, apart de quimiocines com MIP-1 α , MIP-1 β i MCP-1.

Els mioblastes humans tenen la capacitat d'estimular les cèl.lules mononuclears de la sang i aconseguir que proliferin, secretin IFN- γ i es converteixin en citotòxiques.

En les cèl.lules inflamatòries que infiltren les malalties musculars autoimmunes s'ha demostrat la presència de molècules coestimulants, i una gran varietat de citocines i quimiocines. La descripció detallada d'aquestes troballes queda fora de l'abast del present estudi. Resumirem dient que els estudis suggereixen una activa interacció entre les cèl.lules del sistema immune i les fibres musculars, que contribuiria a la perpetuació de la resposta inflamatòria a les miositis (Bartocconi 1994, Lundberg 1998, Nagaraju 2001).

Recapitulant, les dades disponibles actualment suggereixen que una cèl.lula com el miòcit, que no pertany al sistema immune, por *adquirir l'habilitat* de sintetitzar molècules del MHC, molècules d'adhesió, citocines i quimiocines. Més concretament, sota un ambient inflamatori les cèl.lules musculars esquelètiques expressen molècules

de superfície implicades en el processament i la presentació de l'antigen, i les cèl·lules immunes presents en el teixit muscular expressen molècules d'adhesió i coestimuladores necessàries per a l'activació dels limfòcits T.

V.2.1.6.a. Les citocines poden tenir efectes ambivalents en el teixit muscular.

Fins ara hem descrit com la cèl·lula muscular participa en els processos inflamatoris. Molts estudis s'han centrat en els mecanismes capaços de provocar lesió muscular. Darrerament s'ha fet èmfasi en els efectes positius de les citocines a nivell muscular.

Una de les citocines que més s'ha estudiat en relació als músculs és el TNF. En estudis experimentals ha estat implicada en la contractilitat i els fenòmens d'atròfia i regeneració muscular (Langen 2007). En els últims anys s'ha descrit un possible efecte ambivalent d'aquesta citocina. Si bé es cert que s'ha associat a alteracions en la massa i l'estructura dels músculs, hi ha estudis que suggereixen un efecte beneficiós del TNF en el remodelatge muscular.

El nostre grup en comparar biòpsies de pacients amb MPOC amb subjectes sans va evidenciar un increment en l'expressió de citocines proinflamàtores, i en particular TNF, en els M. intercostals dels malalts amb MPOC (Casadevall 2007). Quina significació pot tenir aquesta troballa? El TNF contribueix a la disfunció muscular dels MMRR en pacients amb MPOC degut a un efecte lesiu vinculat a la seva acció proinflamatòria? O, ans al contrari, el TNF participa en el remodelatge muscular i, per tant, juga un paper adaptatiu en els M. intercostals d'aquests pacients?

Estudis experimentals han demostrat que nivells alts de TNF indueixen disfunció contràctil en el diafragma dels animals (Wilcox 1994, Li 2000). Tanmateix, les alteracions diafragmàtiques associades a la distròfia muscular es veuen atenuades en el ratolí amb dèficit de TNF (Gosselin 2003). D'altra banda, les accions del TNF sobre la funció contràctil dels músculs de les extremitats són controvertides.

En tot cas, les causes i conseqüències de l'augment de l'expressió de TNF en els MMRR dels pacients amb MPOC són poc conegudes. En el treball de Casadevall *et al.* abans citat, l'increment en l'expressió de citocines proinflamàtores en els M. intercostals de pacients amb MPOC s'acompanyava d'una tendència a observar més dany al sarcolemma de les fibres musculars. Aquest fet podria ser degut a que la expressió de TNF a nivell local podria estar involucrada en la lesió muscular, però també en el procés de reparació.

Totes aquestes troballes aparentment contradictòries es podrien explicar pels diferents efectes provocats per les citocines depenent de les concentracions que assolixin a nivell local i de la durada de l'increment de la seva expressió a nivell del múscul (Langen 2007). Així, s'ha vist que nivells baixos de TNF suposen un estímul per a la diferenciació i regeneració muscular, mentre que altes concentracions de TNF inhibeixen el procés de regeneració per la via del NF- κ B, que participa en el control del factor regulador miogènic MyoD. Alguns dels efectes beneficiosos del TNF a baixes concentracions en el procés de regeneració muscular podrien ser deguts a que afavoreix el reclutament de macròfags i neutròfils, així com la quimiotaxi de mioblastes.

Amb la informació precedent, semblaria que el TNF podria afectar els processos de remodelatge-regeneració muscular de manera positiva o negativa, depenent del moment, la durada, la magnitud i la composició de la resposta inflamatòria. S'hauria d'avaluar en posteriors estudis si el comportament de les altres citocines és equiparable al del TNF.

V.2.2. Inflamació sistèmica i disfunció muscular a la MPOC.

Després de constatar la presència d'una resposta inflamatòria sistèmica a la MPOC, i que aquests malalts pateixen una disfunció muscular ben documentada, estudis recents han intentat explicar els vincles que existeixen entre ambdós processos (Remels 2007).

En un altre apartat del present treball hem vist com la MPOC no pot ser considerada com un trastorn pulmonar localitzat, sinò que és una malaltia sistèmica que afecta diferents teixits extrapulmonars. Entre les manifestacions sistèmiques més estudiades en els darrers anys hi ha una particular resposta inflamatòria crònica, anomenada de "baix grau", i les alteracions en el metabolisme proteic que acaben provocant atròfia muscular i, en fases més evolucionades, caquèxia.

V.2.2.1. Disfunció muscular (perifèrica) a la MPOC.

S'han descrit alteracions estructurals i metabòliques en els músculs perifèrics dels pacients amb MPOC moderada o severa. Totes dues alteracions comporten una menor *força* i *resistència* muscular. Aquesta disfunció muscular esquelètica determina una limitada *capacitat d'exercici* a la MPOC, amb importants implicacions pronòstiques i sobre la qualitat de vida dels pacients (Remels 2007).

La força dels músculs ve determinada fonamentalment per la massa muscular. Les dades que disposem actualment indiquen clarament que els músculs dels pacients amb MPOC presenten un grau variable d'atròfia. Les fibres més afectades són les de metabolisme predominantment glucolític (IIa i IIx) (Gosker 2002, Jagoe 2003). La pèrdua de massa muscular és un procés complex que depèn d'alteracions en el metabolisme proteic i en el recanvi de les cèl.lules musculars. Un empitjorament del metabolisme proteic acabarà produint atròfia muscular quan la degradació superi a la síntesi de proteïnes. En pacients amb emfisema que tenien un pes per sota del normal, s'ha demostrat una capacitat de síntesi proteica disminuïda a nivell muscular (Morrison 1988). Així mateix, el catabolisme proteic miofibril·lar de malalts caquètics amb MPOC es troba incrementat respecte als subjectes sans (Rutten 2006).

La resistència muscular disminuïda no s'associa amb la pèrdua de massa del múscul. Hi ha múltiples factors que hi influeixen, com són el nombre de capil·lars, el tipus fibril·lar, la densitat mitocondrial, i l'activitat dels enzims de la cadena respiratòria. En els M. de malalts amb MPOC s'ha descrit un desplaçament cap a les fibres de contracció ràpida, menys resistents a la fatiga. En el M. quàdriceps es va trobar una menor proporció de fibres de tipus I i el corresponent increment de fibres de tipus IIx, quan es van comparar malalts amb MPOC i subjectes sans (Gosker 2002^(b)). El fenotip fibril·lar determina, en gran part, l'activitat enzimàtica muscular. Els M. perifèrics dels malalts amb MPOC presenten una activitat enzimàtica reduïda pel que fa als enzims que intervenen en el metabolisme oxidatiu. Per contra, l'activitat enzimàtica dels enzims glucolítics es troba augmentada en els M. de les extremitats inferiors (Jakobsson 1995). També s'ha descrit una afectació en el metabolisme energètic dels pacients amb MPOC. Els dipòsits de glucogen muscular es troben disminuïts i els nivells de lactat són més alts que en els individus control (Kutsuzawa 1995, Maltais 1996). Aquestes dades indiquen que el metabolisme energètic anaerobi es troba incrementat a la MPOC. Això implica una menor eficiència energètica (menor producció d'ATP que la via oxidativa), que complica la capacitat de fer exercici d'aquest pacients. Perquè, a més a més, els malalts amb MPOC tenen una despesa energètica incrementada. Per acabar, els marcadors d'estrès oxidatiu estan elevats al M. esquelètic dels pacients amb MPOC, tant en repòs com durant l'exercici (Rabinovich 2001, Barreiro 2003).

V.2.2.2. Inflamació sistèmica a la MPOC.

A mesura que progressa la malaltia, la MPOC s'associa a un intens procés inflamatori a nivell pulmonar. Però, com ja s'ha comentat, a més de la inflamació de la via aèria, avui dia tenim evidències de la presència d'inflamació de baix grau o de baixa intensitat a nivell sistèmic (Remels 2007). Aquesta inflamació sistèmica sembla relacionar-se inversament amb el FEV₁, el que podria indicar la seva importància en la progressió de la malaltia (Donaldson 2005).

La inflamació sistèmica persistent a la MPOC es va evidenciar a l'observar nivells elevats de citocines proinflamatòries, com són el TNF, la IL-6, la IL-8 i els receptors solubles del TNF (Wouters 2002). La IL-6 i el TNF són capaços d'induir la formació de reactants de fase aguda. La Proteïna C Reactiva (PCR) és una de les

proteïnes de fase aguda més importants. Els nivells de PCR circulant es troben augmentats en malalts amb MPOC, i s'han associat amb una disminució de la força del quàdriceps, una reducció en la capacitat de realitzar exercici i un increment de la mortalitat (Broekhuizen 2006, Yende 2006).

Curiosament, no s'ha trobat una clara correlació entre la inflamació local (de la via aèria) i la inflamació sistèmica en pacients amb MPOC. Malgrat s'accepta el paper fonamental de la inflamació pulmonar en la patogènia i la progressió de la malaltia, la resposta inflamatòria sistèmica no sembla venir donada simplement per un alliberament de mediadors inflamatoris que provenen dels pulmons. Una font potencial de mediadors inflamatoris són les cèl.lules inflamatòries circulants. Diferents estudis han mostrat nivells augmentats de neutròfils i limfòcits en la sang circulant dels pacients amb MPOC. Paral·lelament, s'ha descrit l'activació de limfòcits en sang perifèrica, la qual cosa potencia la seva resposta migratòria i citotòxica (Noguera 1998).

Un segon factor que podria estar involucrat en el procés inflamatori sistèmic és la hipòxia, que sovint es troba present en els malalts amb MPOC severa. Estudis *in vitro* han mostrat que la hipòxia fa augmentar la producció de citocines pels macròfags, el que contribueix a l'activació del sistema del TNF a la MPOC. S'ha descrit una relació inversa entre la pressió arterial d'oxigen (PaO_2) i els nivells circulants de TNF i els seus receptors solubles en malalts amb MPOC (Takabatake 2000).

Els mediadors inflamatoris presents a la sang dels pacients amb MPOC podrien tenir el seu origen a les pròpies fibres musculars, o bé en altres cèl.lules extrapulmonars com poden ser les cèl.lules endotelials i les del teixit adipós. Ja hem comentat com les cèl.lules del M. estriat, per si mateixes, tenen la capacitat de produir citocines proinflamatòries de forma constitutiva o induïble. Sembla ser que les cèl.lules endotelials, els adipòcits i els fibroblasts es comportarien de forma similar.

El TNF i la IL-6 s'han vinculat als processos de caquèxia. Així, doncs, el TNF ha mostrat tenir una relació inversa amb la massa muscular (Langen 2006). Els nivells elevats d'IL-6 s'han associat amb una disminució a la força del quàdriceps i una menor capacitat d'exercici (Yende 2006). Ambdues citocines poden causar debilitat muscular sense una pèrdua important de la massa muscular, compromentent directament les

propietats contràctils del teixit muscular. D'altra banda, els nivells de TNF al M. esquelètic dels malalts amb MPOC semblen ser superiors als dels subjectes sans (Montes de Oca 2005). Els pacients amb MPOC severa i baix pes es caracteritzen per un increment en l'activació del NF-kB a nivell muscular, factor de transcripció nuclear que, com hem vist, és el responsable d'una de les principals vies encarregades de la senyalització intracel.lular en els processos inflamatoris (Agustí 2004).

Resumint, la inflamació sistèmica present en els malalts amb MPOC afecta de manera particular els M. esquelètics, i sembla jugar un important paper en les alteracions de la massa i de la capacitat funcional muscular que pateixen aquests pacients.

V.2.2.3. Resposta cel.lular inflamatòria i múscul.

Fora dels estudis realitzats en les miopaties inflamatòries, polimiositis i dermatomiositis, i els models de lesió muscular postexercici, pocs autors han investigat la presència de cèl.lules inflamatòries en el teixit muscular.

Una revisió (Tidball 2005) relaciona els processos inflamatoris amb la lesió muscular i la seva reparació. Després d'una agressió o d'un exercici suficientment intens, el múscul és invadit per cèl.lules inflamatòries, que poden romandre de dies a setmanes en el teixit muscular. Els primers en arribar són els neutròfils, seguits ràpidament pels macròfags. Aquesta resposta inflamatòria coincideix amb els processos de reparació del múscul, amb la regeneració i creixement que segueixen a l'activació i proliferació de les cèl.lules satèl.lit musculars.

Les investigacions més recents assenyalen que les cèl.lules inflamatòries promouen tant la lesió com la reparació del teixit muscular, mitjançant l'acció combinada dels *radicals lliures*, els *factors de creixement* i les *quimiocines*. Diferents estudis han avaluat les interaccions entre les cèl.lules inflamatòries i les fibres musculars.

S'ha vist que els neutròfils són capaços de provocar dany muscular. Fins ara no s'ha demostrat que aquestes cèl.lules juguin un paper beneficiós en la reparació i la

regeneració muscular, malgrat s'ha plantejat que la seva acció sobre els detritus cel·lulars podria preparar el camí per a una reparació tissular òptima.

Els macròfags també promouen el dany muscular tant *in vivo* com *in vitro*. Hi podrien estar implicades les citocines que produeixen i els radicals lliures. Tanmateix, està ben documentada la participació dels macròfags en els processos de reparació i regeneració muscular, a través dels factors de creixement i dels senyals mediat per altres citocines. Hi ha autors, però, que consideren que el paper dels macròfags en la regeneració muscular encara no es pot considerar del tot provat, doncs hi ha altres cèl·lules presents en el múscul que poden produir mediadors que intervinguin en la reparació muscular. Ja hem vist com la pròpia cèl·lula muscular pot alliberar substàncies reguladores de les cèl·lules inflamatòries, jugant un paper actiu i modulant, així, el procés inflamatori.

V.2.2.4. Cèl·lules inflamatòries i múscul a la MPOC.

Pel que fa a les malalties respiratòries hi ha 3 estudis principals que han avaluat la presència de cèl·lules inflamatòries en els M. estriats dels éssers humans.

En primer lloc, MacGowan i col·laboradors (MacGowan 2001) van estudiar mostres de diafragma en 21 pacients que van ser intervinguts d'una toracotomia per càncer de pulmó o altres malalties pulmonars. La població estudiada tenia una edat mitjana de 62 ± 10 anys (rang de 43 a 81), un BMI de $24,6 \pm 4$ Kg/m² (rang de 16,7 a 31,1), i un FEV₁ de 74 ± 34 % pred (rang de 16 a 122%). Van identificar i quantificar els macròfags que hi havia al múscul mitjançant immunohistoquímica i microscopia òptica. Les imatges van ser captades i analitzades a 125 augments. El nombre de macròfags va ser expressat per fibra i per mm². No hi havia infiltrats de cèl·lules inflamatòries. Van trobar macròfags distribuïts a nivell de les diferents capes de teixit connectiu, tant a nivell de l'endomisi com del perimisi. No van identificar cap macròfag a l'interior de les fibres musculars. El número de macròfags en el múscul diafragmàtic va ser de 52 ± 19 per mm² de teixit muscular (rang de 18 a 85). El grau d'obstrucció a la via aèria no guardava relació amb el nombre de macròfags.

D'altra banda, l'equip de Gosker (Gosker 2003) va avaluar les característiques miopatològiques del M. vast extern (*M. vastus lateralis*) en malalts amb MPOC. Una de les característiques que van estudiar va ser la presència de cèl.lules inflamatòries. Varen incloure 15 pacients (12 homes) amb MPOC i pes conservat, i 16 individus control (14 homes) d'edat semblant. L'edat mitjana dels subjectes amb MPOC era de 67 ± 9 anys (rang 42 a 76), el BMI de $23,9 \pm 4$ kg/m² i la funció pulmonar representada pel FEV₁ de 42 ± 14 % del valor predit. La identificació de cèl.lules inflamatòries en el múscul es va fer mitjançant immunohistoquímica, utilitzant anticossos monoclonals contra l'antigen comú leucocitari (CD45) i contra els macròfags (CD68). Totes les troballes miopatològiques van ser avaluades semiquantitativament per mitjà d'un sistema de puntuació que anava de 0 a 5. Un patòleg expert assignava les puntuacions, considerant que 0 era l'absència d'anomalia i 5 les alteracions més severes. En referència a les cèl.lules inflamatòries, no es detalla el nombre de cèl.lules presents, i leucòcits i macròfags van ser comptats conjuntament. Utilitzant aquesta escala semiquantitativa, cap dels pacients amb MPOC va arribar a tenir puntuacions iguals o superiors a 2 pel que fa a les cèl.lules inflamatòries. Més concretament, els quàdriceps de 12 pacients no mostraven cap cèl.lula inflamatòria, i 3 malalts només en presentaven *poques* (puntuació 1 a l'escala abans comentada).

Finalment, Montes de Oca *et al.* (Montes de Oca 2005) van estudiar diversos marcadors d'inflamació en el M. quàdriceps femoral de malalts amb MPOC i els van comparar amb subjectes sans. Avaluaren citocines, expressió de les isoformes de l'òxid nítric sintetasa (NOS), i marcadors d'estrès nitrosatiu i de cèl.lules inflamatòries. Van incloure 15 malalts amb MPOC (8 homes) i 14 individus sans (6 homes). Els pacients amb MPOC tenien una edat mitjana de 64 ± 8 anys, el BMI de $21,5 \pm 5$ kg/m² i el FEV₁ de 43 ± 11 % del valor predit. Es descriuen els marcadors de cèl.lules inflamatòries en el múscul homogeneïzat: CD163 com a marcador de macròfags i CD159 per a les cèl.lules T. Només es van identificar i quantificar els macròfags en 4 subjectes amb MPOC i 4 individus control. Es va utilitzar una tècnica immunohistoquímica amb anticòs monoclonal anti-CD68. Refereixen que el nombre de macròfags és força superior als individus amb MPOC quan els comparem amb els sans (296 ± 98 vs 6 ± 3 cèl.lules per mm³, $p < 0,05$). També troben que els nivells en múscul de CD163 i TNF eren superiors en els malalts amb MPOC. Per acabar, en tots els pacients amb MPOC en que es van

analitzar les mostres mitjançant microscopia electrònica també es van identificar macròfags.

En resum, hi ha dades que suggereixen l'existència d'un procés inflamatori a nivell muscular en pacients amb MPOC. Això és especialment manifest pel que fa als mediadors químics de la inflamació, però estudis recents han descrit també la presència de cèl.lules inflamatòries al teixit muscular dels malalts amb MPOC, tant a nivell dels M. perifèrics com als MMRR.

VI. L'“OVERLAP SYNDROME”.

Entenem per *Overlap Syndrome* respiratori (OS) la coexistència en un mateix malalt de la Malaltia Pulmonar Obstructiva Crònica (MPOC) i la Síndrome d'apnees-hipopnees del son (SAHS) (Flenley 1985). No hem trobat una denominació específica en llengua catalana, pel que continuarem utilitzant el terme anglès. Possiblement seria vàlid el nom de “Síndrome de Composició”.

Malgrat l'abundància d'estudis sobre les dues entitats per separat, es coneix molt poc sobre les conseqüències clíniques i terapèutiques que es deriven de patir totes dues alhora.

Inicialment farem una breu descripció sobre les conseqüències del son en malalts amb MPOC, per passar a continuació a descriure l'OS pròpiament dita.

VI.1. LA MPOC I EL SON.

Actualment són ben coneguts els efectes del son sobre la respiració, que no comporten cap repercussió clínica rellevant en el subjecte sa, però que poden presentar efectes molt perjudicials en malalts amb MPOC. Bàsicament consisteixen en un grau més o menys lleu d'hipoventilació i una resposta disminuïda als estímuls respiratoris (McNicholas 2000).

Inicialment es va observar que els pacients amb MPOC presentaven una disminució de les xifres de *pressió arterial d'oxigen* (PaO_2) i un augment de la *pressió arterial de diòxid de carboni* (PaCO_2) durant la nit. Tots aquests canvis són més freqüents i més greus durant la fase REM (de l'anglès “rapid eye movement”) del son. També s'ha observat que els malalts amb un fenotip de bronquítics crònics (antigament MPOC tipus B) sofreixen dessaturacions més importants que els pacients amb enfisema pulmonar (MPOC tipus A).

Els efectes del son sobre la respiració poden resumir-se com:

- 1 - canvis a nivell del *control respiratori central*
- 2 – increment de la *resistència a la via aèria*
- 3 – canvis en l'activitat dels *músculs respiratoris*

A nivell del sistema nerviós central s'ha observat que el centre respiratori presenta una resposta disminuïda en front d'estímuls químics, mecànics i corticals. A més a més, la resposta dels músculs respiratoris als impulsos centrals també es troba disminuïda. Sembla ser que els músculs respiratoris accesoris estan molt més afectats que no pas el diafragma, que es troba pràcticament preservat en la seva activació (Johnson 1984).

També s'ha descrit una tendència a la broncoconstricció nocturna en els pacients amb MPOC, que podria estar vinculada al predomini del to parasimpàtic que es produeix durant el son.

Hom coneix que en els subjectes sans durant el son, a nivell muscular es produeix una marcada reducció de l'activitat dels músculs intercostals quan són avaluats mitjançant estudis electromiogràfics (Tusiewicz 1977). Sembla ser que això és més pronunciat en els pacients amb MPOC. D'altra banda, la funció pulmonar diürna d'aquests malalts, depèn en part de la utilització de la musculatura respiratòria accesoris. Es podria pensar que la hipoactivitat nocturna dels M. intercostals podria tenir un paper perjudicial per un efecte de "manca d'ús" (efecte contrari a l'entrenament). Així mateix, la posició en decúbit i la hiperinflació pulmonar redueixen l'eficàcia de la contracció diafragmàtica.

VI.1.1. Mecanismes responsables de les dessaturacions nocturnes en els malalts amb MPOC.

Els possibles mecanismes implicats en la davallada de la saturació d'oxigen durant la nit en pacients amb MPOC són: la *hipoventilació*, una predisposició a la dessaturació nocturna, i l'empitjorament en la relació *ventilació/perfusió* (V_A/Q). A més,

cal considerar la possible coexistència amb una Síndrome d'hipoventilació-obesitat o una SAHS, com més endavant comentarem.

Durant totes les fases del son (però sobretot a la fase REM) es veu reduïda la ventilació minut, sobretot a expenses d'una disminució del volum corrent o volum *Tidal*. També es troba disminuïda la capacitat funcional residual (FRC) probablement com a resultat de la hipotonia dels músculs respiratoris, el desplaçament cap amunt del diafragma i un descens en la distensibilitat pulmonar ("compliance"). Això, dóna lloc a un efecte "shunt" (curtcircuit), amb zones del pulmó perfundides però no ventilades, amb el corresponent deteriorament en l'intercanvi de gasos.

Hi ha una relació inqüestionable entre els nivells d'hipoxèmia diürna i la gravetat de les dessaturacions durant el son (Weitzenblum 2004). Aquells pacients que presenten una major hipòxia durant el dia són els que tenen un nivells d'oxigen arterial més baixos quan dormen.

Val a dir que el millor índex per avaluar les dessaturacions associades al son no sembla ser el nombre de dessaturacions que es produeixen al llarg de la nit, ni la saturació mínima enregistrada, sinó la saturació d'oxigen (SaO_2) mitjana o el percentatge de temps que un pacient ha estat per sota d'una determinada SaO_2 . Un dels paràmetres més utilitzats és el T90, que és el temps transcorregut per sota d'una SaO_2 del 90%. La major part dels aparells de son actuals incorporen un *software* que permet accedir fàcilment a aquestes dades.

En resum, si bé la hipoventilació alveolar és el principal mecanisme que explica la hipoxèmia relacionada amb el son, com ja s'ha apuntat anteriorment, les alteracions V_A/Q també participen significativament en la patogènia de les dessaturacions nocturnes. L'empitjorament en la relació V_A/Q durant el son en pacients amb MPOC és degut a la disminució de la FRC. Com sempre, aquesta és més pronunciada durant la fase REM, i provoca el tancament de la via aèria petita amb un desequilibri entre la ventilació i la perfusió pulmonar a aquest nivell.

VI.1.2. Conseqüències de la hipoxèmia associada al son.

La hipòxia durant el son que s'observa en pacients amb MPOC provoca *vasoconstricció pulmonar* que pot conduir, a la llarga, a l'aparició d'hipertensió arterial pulmonar. Hi ha que puntualitzar que els estudis que s'han realitzat sobre hemodinàmia pulmonar en pacients amb MPOC han inclòs de manera majoritària individus amb malaltia greu i que, per tant, també presentaven hipoxèmia diürna.

A nivell cardiovascular, apart dels efectes ja esmentats sobre la circulació pulmonar, durant els episodis de dessaturació a la fase REM, s'han objectivat unes demandes d'oxigen augmentades a nivell miocàrdic. També s'ha descrit que els malalts amb MPOC presenten amb major freqüència arítmies supraventriculars i ventriculars, sobretot extrasístoles. Però la prevalença real i la rellevància clínica de les arítmies durant el son en pacients amb MPOC no és ben coneguda.

La SaO₂ nocturna en malalts amb MPOC té una relació amb la supervivència. El pronòstic és pitjor quan més petita és la SaO₂ mitjana durant la nit i quan menor és la SaO₂ mínima nocturna (Connaughton 1988). Novament ens trobem amb el fet que la major part dels pacients estudiats també presentaven hipoxèmia durant el dia, i que aquesta també es correlaciona amb la mortalitat. Caldrien més estudis per poder demostrar que la hipoxèmia nocturna, com a factor independent, disminueix l'esperança de vida dels malalts amb MPOC.

VI.1.3. Trastorns del son en els pacients amb MPOC.

Igualment important és el deteriorament, tant subjectiu com objectiu, de la qualitat del son a la MPOC. Els malalts amb MPOC presenten més dificultats per a començar el son i utilitzen més hipnòtics que la població sana. Malgrat tot, no sembla que manifestin més somnolència diürna, al menys de l'objectivable pel *Test de latència múltiple del son* (MSLT de "Multiple Sleep Latency Test", en anglès). D'altra banda, no s'ha trobat una relació estadísticament significativa entre la percepció subjectiva i el grau de dessaturació nocturna.

Són diversos els estudis que han objectivat una mala qualitat del son a la MPOC greu (Weitzenblum 2008). S'ha descrit com l'inici del son es retarda, el temps total de son es menor i els períodes en que el malalt es troba totalment despert durant la nit són freqüents i prolongats. En resum, hi ha una menor eficiència del son (temps total de son dividit pel temps al llit) i també trobem alteracions en l'hipnograma (temps invertit en estadis REM i no REM). A més, el nombre de despertars subclínic és superior en pacients amb MPOC que en sans, essent els pacients amb pitjors saturacions nocturnes els que presenten un nombre major *d'arousals*. El tractament amb oxigenoteràpia nocturna no ha demostrat resultats prou clars en la millora de la qualitat del son.

Paradoxalment, un estudi que inclou malalts amb MPOC menys greu (Sanders 2003), només ha mostrat mínimes alteracions en el son d'aquests pacients que, d'altra banda, presentava una arquitectura conservada. Més endavant analitzarem amb més detall aquest treball.

Podem concloure que la fragmentació del son a la MPOC té un origen multifactorial, i no pot ser atribuïda exclusivament a la hipoxèmia o a la MPOC per si mateixa. Altres factors com la dispnea, la tos, l'acumul de secrecions i la ingesta de fàrmacs (p.e. xantines i betamimètics) capaços d'alterar les característiques del son, hi juguen un paper important. Sense oblidar, en els individus de més edat, els efectes produïts per l'envelliment sobre la qualitat del son.

VI.2. L'OVERLAP SYNDROME (COEXISTÈNCIA DE MPOC I SAHS).

Tant la MPOC com la SAHS són dues entitats freqüents, que afecten respectivament al voltant d'un 10 i un 5% de la població adulta de més de 40 anys. No és estrany, doncs, que coincideixin en un mateix pacient. En un estudi de malalts amb SAHS es va veure que un 11% tenien també MPOC associada (Chaouat 1995). Però, l'estudi epidemiològic més ben dissenyat fins ara (prospectiu, multicèntric i de tipus cohorts), l'anomenat *Sleep Heart Health Study* (SHHS), va mostrar que la prevalença d'apnees del son en pacients amb MPOC era similar a la de la població general de la mateixa edat (Sanders 2003).

VI.2.1. Qualitat del son.

Ja hem comentat com en malalts amb MPOC s'havien demostrat diferents alteracions del son mitjançant estudis amb registres electroencefalogràfics (Weitzenblum 2008). D'altra banda, el SHHS, en estudiar 1138 pacients amb MPOC moderada, va trobar que en absència d'apnees, la qualitat del son estava mínimament afectada. A l'estratificar en grups la població estudiada, no es varen observar diferències en l'arquitectura del son, quan es van comparar els quartils més baixos amb els més alts de FEV₁. Sembla ser, doncs, que la MPOC *per se*, al menys en les seves formes menys greus, no afectaria la qualitat del son de manera significativa. No obstant, els mateixos autors (Sanders 2003) descriuen com els subjectes amb OS, en ser comparats amb individus amb MPOC sola, tenien unes puntuacions més altes a l'Escala de Somnolència d'Epworth (ESS, de l'anglès "Epworth Sleepiness Scale"), un menor temps total de son, una menor eficiència del son, i un índex *d'arousals* superior. Només es van trobar petites diferències entre els individus amb SAHS aïllada i els OS. Podem concloure, doncs, que en l'estudi SHHS, la qualitat del son en els pacients amb MPOC es troba influenciada per la presència de la SAHS, però no per la gravetat de l'obstrucció al flux aeri.

VI.2.2. Saturació d'oxihemoglobina durant la nit.

Després d'estudiar prospectivament 265 pacients amb diagnòstic de SAHS confirmat (Índex d'apnees i hipopnees o "AHI" > 20/h), Chaouat i cols. van trobar que 30 subjectes presentaven una alteració ventilatòria de tipus obstructiu ($FEV_1/FVC \leq 60\%$). Aquests malalts amb OS no diferien de la resta respecte a la gravetat de la SAHS però, en canvi, presentaven unes xifres de SaO_2 mitjana durant la nit que eren inferiors. En conclusió, els autors afirmen que els pacients amb OS semblen presentar més hipoxèmia nocturna que els individus amb SAHS (Chaouat 1995). Aquest fet es va confirmar en treballs posteriors, i es manté després d'ajustar els valors de SaO_2 durant la nit segons l'edat, el sexe, l'alçada, la raça, el consum de tabac i la SaO_2 amb l'individu despert (Sanders 2003).

Analitzant els diferents estudis que hi ha sobre el tema es pot dir que el risc de dessaturacions nocturnes és clar en subjectes que presenten hipoxèmia diürna, però també existeix en malalts amb un OS menys greu, que presenten una alteració ventilatòria obstructiva moderada (Weitzenblum 2008).

VI.2.3. Funció pulmonar i gasos arterials durant el dia.

Apart de les evidents diferències en el quocient FEV_1/FVC , s'ha descrit que els pacients amb OS tenen uns volums pulmonars menors que els subjectes amb SAHS sola (Chaouat 1995). Aquests darrers investigadors van observar en 30 malalts amb OS que la capacitat pulmonar total (TLC) presentava valors dins de la normalitat (no existia hiperinsuflació estàtica). Val a dir que els pacients enrolats en els pocs estudis que hi ha sobre la OS presenten una alteració ventilatòria obstructiva lleu o moderada, que podria fer que les diferències entre els grups estudiats fossin menys pronunciades.

La coexistència de MPOC i SAHS afavoreix la presència d'hipoxèmia diürna, que rarament es observada en els estudis que han inclòs pacients que només pateixen SAHS (Weitzenblum 2008). Tanmateix, els nivells de $PaCO_2$ dels individus amb OS semblen ser més alts que els dels pacients amb SAHS aïllada. Un 27% de malalts amb OS presentaven hipercàpnia en front d'un 8% dels individus amb SAHS (Chaouat 1995).

Kessler *et al.* (Kessler 2001) van comparar pacients que patien OS amb malalts amb la *síndrome d'hipoventilació-obesitat*, tots ells en situació estable de la malaltia, després de transcórrer diverses setmanes des de l'última exacerbació. La hipoxèmia i la hipercàpnia eren més importants en els individus amb hipoventilació-obesitat.

VI.2.4. Hipertensió arterial pulmonar.

Els pacients amb OS semblen tenir un risc augmentat de patir hipertensió arterial pulmonar (HTP), fins i tot quan la seva alteració ventilatòria obstructiva no és greu. Dels 30 subjectes amb OS estudiats per Chaouat *et al.* (Chaouat 1995), a 26 s'els hi va practicar un cateterisme dret cardíac, trobant-se una prevalença de HTP del 36%. Per contra, el grup amb SAHS va mostrar una prevalença del 9%.

És ben conegut que els pacients amb MPOC solen desenvolupar HTP quan tenen una obstrucció bronquial greu o molt greu ($FEV_1 < 50\%$ dels valors predits i, en general ≤ 1000 ml.), que els condiciona una important hipoxèmia. Hom pensa que la hipoxèmia afavoreix la HTP al provocar vasoconstricció pulmonar persistent. Diferents autors assenyalen que els malalts amb OS poden desenvolupar HTP malgrat tinguin una funció pulmonar relativament conservada (Bradley 1986, Alford 1986, Fletcher 1987, Chaouat 1995). L'explicació d'aquest fet podria venir donada pels efectes sinèrgics d'ambdues malalties sobre l'intercanvi de gasos i l'hemodinàmia pulmonar.

A més a més, en els pacients amb MPOC la HTP sol observar-se quan la PaO_2 diürna és inferior a 55 o 60 mmHg. En els diferents estudis analitzats, la PaO_2 diürna dels malalts amb OS era al voltant de 65 mmHg (Weitzenblum 2008). S'ha de tenir en compte, però, que la PaO_2 d'aquests mateixos pacients durant el son és certament inferior a aquestes xifres, degut a la repetició successiva de les apnees i hipopnees. En resum, la combinació d'una hipoxèmia nocturna marcada i una hipoxèmia diürna entre lleugera i moderada, podria explicar l'aparició de HTP.

VI.2.5. Diagnòstic i tractament dels pacients amb OS.

Quant al diagnòstic, en els pacients amb MPOC no es recomanen estudis del son de forma rutinària (Douglas 1990), malgrat hem comentat que tant l'OS com els trastorns del son són freqüents en aquest tipus de malalts. La polisomnografia només estaria indicada en pacients en els que es sospita que, a més a més, pateixen SAHS. Hom ha de descartar SAHS en tot pacient amb MPOC que presenti símptomes clàssics de SAHS, policitemia o signes de hipertensió pulmonar amb una PaO₂ diürna superior a 60 – 65 mmHg.

Són ben coneguts els efectes beneficiosos dels tractaments de les dues entitats per separat (MPOC i SAHS). La CPAP nasal és el principal tractament de la SAHS en l'actualitat i ha demostrat la seva eficàcia en la supressió de les apnees, les hipopnees i la hipoxèmia relacionada amb el son, així com dels símptomes i complicacions que s'en deriven. Probablement, la seva principal limitació sigui la manca d'adherència al tractament. No ens consten dades sobre el compliment terapèutic en subjectes amb MPOC comparats amb individus amb SAHS aïllada. Tampoc ens consten estudis pronòstics en aquest subgrup de pacients. Probablement el seguiment dels malalts amb OS no hauria de ser diferent de la resta de pacients amb SAHS.

La CPAP però, pot ser ineficaç per corregir la hipoxèmia nocturna en malalts amb MPOC associada (Kessler 1996). En aquests pacients pot persistir un cert grau d'hipòxia quan dormen, especialment en la fase REM. Per això, és necessari afegir oxigen suplementari quan la saturació mitjana d'oxigen durant la nit és inferior al 90% sota tractament amb CPAP. Val a dir que, en pacients amb MPOC greu i hipercàpnia severa que no presenten SAHS, la ventilació no invasiva nocturna no ha demostrat fins ara efectes beneficiosos a llarg termini. En canvi, els resultats de la ventilació no invasiva en malalts amb la síndrome d'hipoventilació-obesitat són excel·lents. No hem trobat cap estudi que avaluï aquesta modalitat de tractament en individus amb OS.

Tanmateix, els pacients amb OS més greu, malgrat es tractin correctament les apnees i hipopnees nocturnes, poden mostrar una persistència de la hipoxèmia durant el dia. Aquests subjectes, a més de continuar amb la CPAP, necessitaran

oxigenoteràpia contínua domiciliària durant més de 16 o 18 hores al dia, sempre que compleixin els criteris estandaritzats per a fer el tractament amb oxigen.

Adicionalment, és prudent recomanar les mateixes pautes de tractament farmacològic de la MPOC en els pacients amb OS. Certs fàrmacs (anticolinèrgics) semblen millorar els paràmetres del son dels malalts amb MPOC. No tenim coneixement de cap estudi que hagi avaluat aquests fàrmacs a l'OS.

Finalment, hi ha evidències creixents de nombrosos trastorns que s'associen tant a la SAHS com a la MPOC. Aquesta important comorbiditat fa que sigui necessari optimitzar el tractament de "les altres" patologies associades a l'OS, com són la disfunció ventricular esquerra i diverses complicacions cardiovasculars (Gay 2004).

En conclusió, l'OS és una entitat relativament freqüent. Els malalts amb OS presenten, durant la nit, dessaturacions d'oxigen i alteracions del son més importants que els pacients amb MPOC o SAHS aïllades (Celli 2004). A més, els pacients amb OS presenten un risc augmentat de desenvolupar insuficiència respiratòria i hipertensió arterial pulmonar respecte als malalts amb SAHS aïllada. També tenen una major predisposició a patir les complicacions pròpies de la hipoxèmia crònica. A l'hora de tractar els pacients amb OS cal iniciar la CPAP i considerar la necessitat d'oxigen suplementari durant la nit, sobretot en presència de MPOC greu i cor pulmonale. Així mateix, s'ha d'optimitzar el tractament de les altres patologies associades.

VII. L'OBESITAT.

Per acabar l'apartat d'Introducció, en el que hem intentat fer una síntesi dels diferents coneixements que podrien fer més comprensible el nostre estudi, abordarem el tema de l'obesitat i la seva relació amb diferents alteracions respiratòries, així com els aspectes que la relacionen amb el múscul i els marcadors de la inflamació.

VII.1. GENERALITATS.

L'obesitat és la malaltia metabòlica més freqüent en el món, i la seva prevalença ha anat augmentant progressivament en les darreres dècades (McLean 2008). Segons les previsions de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) cap a l'any 2015 hi haurà aproximadament 700 milions d'adults amb obesitat en el món, la qual cosa suposarà un 10% de la població mundial com a mínim.

L'impacte econòmic associat al control sanitari de l'obesitat és enorme. A més a més, l'obesitat és una de les entitats que més contribueix a l'increment de les xifres de morbiditat i mortalitat arreu del món. Inicialment l'obesitat era considerada un problema dels països desenvolupats, però avui dia se sap que afecta a totes les edats i a tots els grups socioeconòmics (WHO 2006).

Entre les malalties més prevalents en individus obesos constan la diabetis, les malalties cardiovasculars, les malalties musculesquelètiques i les neoplàsies. Nosaltres posarem una especial atenció en la repercussió de l'obesitat sobre la funció respiratòria, i en malalties respiratòries que han estat relacionades amb l'obesitat. D'aquestes, les més importants són la MPOC, l'asma, la malaltia tromboembòlica pulmonar i la pneumònia per aspiració. Menció apart mereixen la SAHS i la síndrome d'hipoventilació obesitat. La primera ha estat tractada amb més detall en un altre capítol de la present tesi.

VII.1.1. Definició d'obesitat.

Es defineix l'obesitat com un acúmul excessiu de greix que provoca un increment generalitzat de la massa corporal, i que posa a l'individu en una situació de risc per a la salut (Arrizabalaga 2003). El paràmetre més utilitzat per a mesurar l'adipositat general és l'índex de massa corporal o "Body Mass Index" (BMI), en anglès. També anomenat "Índex de Quetelet", va ser definit per aquest autor belga l'any 1835. El BMI es calcula segons la fórmula:

$$\text{BMI} = \text{Pes (Kg)} / \text{alçada}^2 \text{ (m)}$$

Definim l'obesitat seguint els criteris acceptats pels National Institutes of Health (NIH) dels Estats Units de Nordamèrica i la OMS, com un índex de massa corporal o BMI igual o superior a 30 Kg/m². S'entén per sobrepès el BMI comprès entre 25 i 29,9 Kg/m². Es considera normal un BMI comprès entre 19 i 24,9 Kg/m². Quan els individus igualen o superen els 40 Kg/m² es parla d'obesitat mòrbida.

El BMI té les seves limitacions, doncs només contempla el pes global de l'individu, i quan parlem d'obesitat ens referim a un excés de greix al cos sense que es vegin afectats els altres compartiments corporals. Però el BMI té els seus avantatges, ja que és un índex fàcil de calcular i universalment acceptat. Així doncs, el BMI no mesura els nivells de greix corporal. De fet, alguns atletes molt musculosos podrien ser classificats erròniament com a obesos si només s'utilitzés el BMI com a mesura de l'obesitat. Sembla ser que la correlació entre el BMI i l'adipositat depèn de l'edat i el sexe.

Una altra limitació del BMI és que no incorpora la distribució del greix corporal. A més del grau de severitat de l'obesitat, s'ha vist que l'acúmul de greix en zones concretes del cos suposa un factor de risc per a la salut. El greix del cos pot estar preferentment localitzat a l'abdomen (patró d'obesitat androide o abdominal-visceral) o al voltant dels malucs i les cuixes (patró d'obesitat ginecoide). Nombrosos estudis han demostrat que un patró d'obesitat de tipus androide o central reflecteix un acúmul de greix al voltant de les vísceres abdominals, i que s'associa a diverses alteracions metabòliques, com són la dislipèmia, la hipertensió, i la intolerància a la glucosa. Tanmateix, per un mateix nivell de sobrepès, l'individu amb uns dipòsits augmentats

de greix visceral és més probable que desenvolupi els quadres clínics associats amb l'obesitat que més abeix comentem.

L'obesitat central té més transcendència que l'obesitat perifèrica perquè el teixit adipós intraabdominal és metabòlicament més actiu que el perifèric (De Pablos 2007). El greix visceral allibera àcids grassos i citocines que són els causants de les alteracions del metabolisme lipídic i dels hidrats de carboni que afavoreixen la resistència a l'insulina. L'obesitat abdominal és un component essencial de la síndrome metabòlica i un factor de risc per a desenvolupar diabetis mellitus de tipus 2 i malaltia cardiovascular.

La forma més exacta de quantificar el greix visceral és la medició de l'àrea del greix intraabdominal mitjançant tomografia computaritzada (TC) o ressonància magnètica (RM) abdominal, mesurada a nivell de la quarta vèrtebra lumbar. Però en molts estudis epidemiològics i a la pràctica clínica habitual s'utilitza el perímetre de la cintura ("waist circumference" en anglès) per avaluar el greix intraabdominal. També ha estat validat el quocient entre el perímetre de la cintura i el perímetre a nivell del maluc ("waist to hip quotient"). La medició de la circumferència de la cintura s'ha de fer a l'alçada del punt mig entre el marge costal inferior i la cresta ílfaca anterior. Malgrat les diferències interindividuais, la circumferència de la cintura es considera un bon paràmetre per a mesurar el greix visceral i, per tant, el risc per a la salut. Una circumferència de la cintura > 88 cm. en dones i > 102 cm. en homes s'associa a un risc incrementat de presentar malaltia. Darrerament s'han proposat valors més baixos per a definir l'obesitat central que, a més, són diferents segons els grups ètnics (De Pablos 2007). Com el risc cardiovascular és superior en individus asiàtics, s'han proposat valors de perímetre abdominal encara menors per aquest grup de població.

VII.1.2. Epidemiologia de l'obesitat.

L'obesitat s'ha convertit en un problema sanitari de primer ordre en els països desenvolupats. Es pot parlar d'una veritable epidèmia. Es considera que un 27% de la població adulta dels Estats Units de Nordamèrica és obesa. Si es sumen els individus amb sobrepès, la xifra arriba al 60% (York 2004). La prevalença de l'obesitat en aquest

darrer país s'ha incrementat més d'un 50% en els últims 15 anys (ha passat d'un 14,5% a un 27%).

Pel que fa a Europa en els darrers 10 anys la prevalença de l'obesitat s'ha incrementat en un 10-40% segons els diferents països. És especialment preocupant l'augment progressiu de l'obesitat infantil.

A l'Estat espanyol existeix la mateixa tendència a l'augment de l'obesitat. Segons l'estudi SEEDO 2000, la prevalença d'obesitat a Espanya entre la població adulta és del 14,5 % (15,75 % per les dones, i 13,4 % pels homes). Entre els més grans de 55 anys, la prevalença augmenta fins a un 21,6 % en els homes i un 33,9 % a les dones (Aranceta 2003).

VII.1.3. Malalties associades (morbi-mortalitat).

Malgrat inicialment existia una certa controvèrsia, hi ha un grau d'evidència suficient per afirmar que l'obesitat i el sobrepès s'associen a un augment en la morbiditat i la mortalitat dels individus que les pateixen (Adams 2006). De totes maneres hi ha aspectes a tenir amb compte. Els obesos solen ser persones sedentàries i que prenen dietes poc sanes, factors que sens dubte influeixen en el pronòstic d'aquests malalts.

El sobrepès i l'obesitat s'han vinculat a nombroses entitats: diabetis (de l'adult o de tipus 2), cardiopatia isquèmica, accident vascular cerebral de tipus isquèmic, patologia biliar (càlculs i colecistectomia), esteatohepatitis no alcohòlica, osteoartritis, hiperuricèmia i gota, alteracions menstruals en la dona i infertilitat, defectes del tub neural en fills de mares obeses, certs tipus de càncer (pròstata, colon, vesícula biliar, endometri i mama -aquest darrer només en dones postmenopàusiques-), síndrome del túnel carpià, insuficiència venosa i trombosi venosa profunda, i retard en la curació de les ferides.

L'obesitat incrementa el risc quirúrgic i els malalts obesos que ingresen a les unitats de vigilància intensiva (UVI) tenen un pitjor pronòstic. Tanmateix, la qualitat de vida dels obesos sembla ser inferior a la de la població general.

En els darrers anys ha despertat un gran interès en la comunitat científica una "nova" síndrome associada a l'obesitat: la síndrome metabòlica. Malgrat han aparegut diferents definicions podríem resumir dient que la síndrome metabòlica resulta de la combinació d'obesitat central, hiperglicèmia, hipertensió i dislipèmia (Pi-Sunyer 2007). No es tracta, doncs, d'una veritable síndrome de nova aparició, sinò de l'agrupació dels factors de risc més amunt esmentats, per tal de disposar d'una eina útil per identificar els individus amb un risc augmentat de patir diabetis de tipus 2 i malaltia coronària. L'obesitat i la resistència a la insulina juguen un paper preponderant en el desenvolupament de la síndrome metabòlica. Hi ha evidències que la resistència a la insulina s'associa a nivells elevats de leptina, independentment de la grassa corporal total. La leptina és una substància hormonal secretada pel teixit adipós que s'uneix a receptors específics situats a l'hipotàlem per tal de regular el pes corporal i la despesa energètica. La majoria dels obesos presenten uns nivells elevats de leptina, la qual cosa sembla indicar un cert nivell de resistència a l'acció d'aquesta substància.

La major part dels estudis mostren clarament un increment en la taxa de mortalitat quan el BMI és igual o superior a 30. Amb aquests valors de BMI el risc de mort per qualsevol causa s'incrementa d'un 50 a un 100% respecte a la població amb un BMI entre 20 i 25. Les morts de causa cardiovascular són les més freqüents. Cal recordar aquí que la SAHS es considera un factor de risc cardiovascular independent, pel que podria afegir morbi-mortalitat a l'obesitat "per se".

En resum, l'obesitat contribueix de manera important a l'aparició de malalties cròniques molt prevalents en el nostre mitjà, i s'associa a mortalitat prematura, discapacitat i deteriorament de la qualitat de vida.

VII.2. ALTERACIONS RESPIRATÒRIES ASSOCIADES A L'OBESITAT.

Qualsevol observador no entrenat pot descobrir una certa dificultat respiratòria en els individus obesos. L'obesitat per si mateixa s'ha relacionat amb la sensació de dispnea en repòs.

Des del punt de vista respiratori l'obesitat s'ha associat a la SAHS i a altres entitats que cursen amb alteració de la funció pulmonar. Sembla ben establert que l'obesitat per si sola és capaç d'alterar la funció respiratòria en humans, degut a canvis en la mecànica de la paret toràcica que condueixen bàsicament a una disminució dels volums pulmonars. Darrerament s'ha fet èmfasi no solament en el deteriorament de la funció pulmonar degut a la sobrecàrrega mecànica que suposa l'obesitat, sinò també al component inflamatori que contribuiria a provocar aquesta disfunció (Davis 2007). És important identificar els trastorns de la funció pulmonar en obesos, perquè aquests individus corren el risc de patir un important deteriorament respiratori quan estan exposats a altres factors que poden alterar la funció pulmonar, com són el tabaquisme, les infeccions respiratòries i la sedació anestèsica.

Els pacients obesos presenten unes demandes metabòliques augmentades degut al treball muscular extra necessari per a moure un cos amb sobrepès, i també per a fer front a l'increment del treball respiratori, secundari a una disminució de la compliança (capacitat de distensió pulmonar o "compliance", en anglès) de la caixa toràcica deguda a l'acumulació de greix a les costelles, el diafragma i l'abdomen. Així mateix s'ha parlat d'una disfunció muscular respiratòria en individus obesos (veure més endavant) que contribuiria a empitjorar el treball respiratori.

S'ha descrit una resistència augmentada a la via aèria a l'obesitat. S'ha suggerit que podria estar relacionada amb la reducció dels volums pulmonars. A més, diferents molècules proinflamatòries que es troben incrementades en els pacients obesos s'han associat a hiperreactivitat bronquial. És el cas del TNF, la IL-6 i la leptina. Tanmateix, s'han trobat alteracions en la relació ventilació/perfusió (V/Q) que comporten hipoxèmia. Aquesta darrera podria atribuir-se, en part, al tancament d'espais aeris durant la respiració normal dels obesos.

El consum d'oxigen (VO_2) i la producció de diòxid de carboni (VCO_2) estan augmentades a l'obesitat, tant en condicions de repòs com durant l'exercici. A més, els pacients amb obesitat mòrbida necessiten un tant per cent desproporcionadament alt del VO_2 total per a dur a terme el treball respiratori. Per tot això, la ventilació minut dels obesos es troba incrementada respecte als subjectes normals (Jubber 2004).

VII.2.1. Volums pulmonars.

Malgrat que en estudis inicials es suggeria que els pulmons dels obesos eren normals, els efectes de l'increment ponderal sobre el diàmetre de la via aèria semblen negatius. L'any 1990 Rubinstein *et al.*, varen descriure com individus obesos, no fumadors, sense cap altra malaltia associada, presentaven alteracions significatives en les proves funcionals respiratòries, tant en dones com en homes (Rubinstein 1990). Les anormalitats en les proves de funció pulmonar que s'han descrit amb més freqüència en individus obesos han estat el descens en el Volum de Reserva Expiratori ("Expiratory Reserve Volume" -ERV-) i en la Capacitat Residual Funcional ("Functional Residual Capacity" -FRC-). Això pot ser degut a que la sobrecàrrega que suposa l'obesitat disminueix la FRC sense reduir el Volum Residual ("Residual Volume" -RV-), la qual cosa implica un descens del ERV. En general, el RV no disminueix en pacients obesos, trobant-se preservat, fins i tot, en l'obesitat mòrbida.

La relació entre el RV i la Capacitat Pulmonat Total ("Total Lung Capacity"-TLC-) pot estar augmentada. La Ventilació Voluntària Màxima ("Maximal Voluntary Ventilation" -MVV-) i la Capacitat Vital ("Vital Capacity" -VC-) poden trobar-se disminuïdes en subjectes obesos.

Els volums pulmonars dinàmics també es troben afectats, sobretot en l'obesitat mòrbida. En un estudi longitudinal fet a Gran Bretanya amb un seguiment de 7 anys es va constatar que l'increment en la massa corporal era un predictor de disminució del Volum Expiratori Forçat en el primer segon ("Forced Expiratory Volume" -FEV₁-) al llarg del temps, sobretot en els individus de més edat (Carey 1999). Aquesta disminució, però, és proporcional a la de la Capacitat Vital Forçada ("Forced Vital Capacity" -FVC-) pel que la relació FEV₁/FVC sol mantenir-se normal.

S'ha comentat prèviament com l'obesitat central o visceral suposava un increment del risc cardiovascular. A més a més, la distribució del greix corporal sembla presentar efectes independents sobre la funció ventilatòria. FVC, FEV₁ i TLC es troben significativament disminuïts en subjectes amb obesitat central. Hom pensa que això és degut a que el greix emmagatzemat a la cavitat abdominal i a les parets toràcica i abdominal causa una compressió directa de la caixa toràcica, els pulmons i el diafragma, donant lloc a una reducció dels volums pulmonars. Així mateix, l'increment de la pressió intraabdominal i l'elevació del diafragma suposen una alteració de la dinàmica pulmonar, fent que el múscul diafragma actuï en condicions subòptimes, i per tant, amb menys eficàcia ("desavantatge mecànic").

VII.2.2. Efectes de la pèrdua ponderal.

La pèrdua ponderal i, més concretament, la intervenció terapèutica en casos d'obesitat mòrbida, dóna lloc a un augment en els volums pulmonars i millora la funció muscular respiratòria. Així, doncs, després d'una gastroplàstia s'ha demostrat un increment de la FRC, VC, TLC, i MVV. Tanmateix, augmenten la Pressió Inspiratòria Màxima (PIM) mesurada a la boca i la Pressió Expiratòria Màxima (PEM) (Weiner 1998).

Apart de l'augment en els volums pulmonars estàtics i dinàmics, la pèrdua de pes en individus obesos comporta una millora en l'intercanvi de gasos, amb un evident increment de la PaO₂ i una relació V/Q més favorable.

En resum, l'obesitat provoca un deteriorament de la funció pulmonar mitjançant diversos mecanismes. Altera la mecànica de la paret toràcica, redueix els volums pulmonars (principalment la FRC i el ERV), i causa un descens en la compliança respiratòria total degut al dipòsit de greix a nivell tissular. La funció muscular respiratòria presentaria un empitjorament degut als canvis en la configuració de la caixa toràcica, l'acúmulo de greix, i als majors requeriments energètics necessaris per a expandir els pulmons.

VII.3. OBESITAT I SAHS.

L'obesitat és considerada un factor de risc major per a la SAHS. Quasi la meitat dels pacients amb SAHS tenen un BMI $> 30 \text{ Kg/m}^2$. Més encara, en dos estudis independents que van incloure subjectes tributaris de cirurgia bariàtrica, es va observar que complien criteris de SAHS entre un 71 i un 77% dels pacients (Davis 2007). Malgrat tot, la relació causal entre l'obesitat i la SAHS és difícil d'establir. Però, és ben conegut que els símptomes de la SAHS milloren amb la pèrdua de pes (Jubber 2004). En aquest sentit, les dades del Wisconsin Sleep Cohort Study (Peppard 2000) suggereixen que l'increment de pes pot tenir un efecte sobre la SAHS de magnitud equivalent, però en sentit contrari, que la pèrdua ponderal. En aquest estudi, un 20% d'augment de pes es va associar amb un increment del 70% en l'índex d'apnees i hipopnees (AHI), mentre que una reducció del 20% en el pes corporal es va associar a un decrement del 48% en el AHI (Crummy 2008).

Sembla ser que la SAHS és infradiagnosticada en els individus obesos. Donat el risc que presenta aquesta població davant d'un mínim grau de sospita s'hauria de descartar la presència de la SAHS. La història clínica i l'exploració física són determinants en aquest aspecte. El BMI aïllat no ha demostrat prou fiabilitat en la predicció de la SAHS. Però, un BMI igual o superior a 35 Kg/m^2 es considera un factor de risc quan va acompanyat d'una circumferència cervical $> 41 \text{ cm}$, en homes (Davis 2007). La circumferència cervical és el millor paràmetre antropomètric per a predir la SAHS, fins i tot en pacients amb BMI normal (Crummy 2008). En conclusió, es pot afirmar que els principals determinants per a patir SAHS són el BMI, la circumferència cervical i l'espai que hi ha darrera la llengua (McClellan 2008). Més avall es comenten aspectes relacionats amb aquest darrer espai retroglossal.

Hi ha diversos factors comuns que s'han implicat en la patogènia de l'obesitat i la SAHS. Recentment s'han estudiat els canvis a nivell del sistema nerviós autònom i la resposta catecolamínica, les citocines i altres molècules que intervenen en els processos inflamatoris, i la leptina.

En models animals s'ha demostrat que la leptina és capaç de prevenir la depressió respiratòria a l'obesitat. Un dèficit de leptina pot induir hipoventilació en individus obesos. Els humans obesos presenten una leptina plasmàtica aixecada. Els

pacients amb SAHS també semblen tenir uns nivells elevats de leptina, si bé és cert que en alguns estudis són independents del greix corporal total (Jubber 2004). Hom pensa que tant a la SAHS com a l'obesitat hi podria haver resistència a la leptina.

L'associació entre obesitat i SAHS també s'ha explicat per canvis en l'impuls ventilatori central (control de la ventilació per part del sistema nerviós) i anomalies en la via aèria superior, tant pel que fa a la seva funció com a l'estructura.

Des del punt de vista estructural, els acúmuls de greix al coll i a les àrees que envolten la part més col.lapsable de la faringe s'han implicat en la patogènesi de la SAHS. Aquests dipòsits de greix fan que la llum de la via aèria sigui més estreta, afavorint el seu col.lapse (la seva oclusió) durant el son, fet que donaria lloc a les apnees i hipopnees (interrupció o disminució del pas de l'aire, respectivament).

El tamany de les parts toves de la via aèria superior correlaciona amb la gravetat dels trastorns respiratoris durant el son. Els pacients amb SAHS tenen uns dipòsits de greix augmentats a nivell del paladar i de l'úvula. A més, els estudis cefalomètrics han confirmat que l'augment de les parts toves a nivell de la via aèria superior pot jugar un paper important en el desenvolupament de la SAHS (Jubber 2004).

Però, a més de les alteracions anatòmiques, hi ha una sèrie d'anomalies funcionals a nivell de la via aèria dels pacients amb SAHS. Els subjectes amb SAHS presenten una major col.lapsabilitat de la faringe tant durant el son com quan estan desperts. S'ha suggerit que una disfunció dels músculs dilatadors de la faringe podria contribuir a aquest fet en subjectes predisposats. Però, la capacitat de la faringe de mantenir la seva llum oberta ("patency", en anglès) no depèn exclusivament de l'acció dels músculs de la via aèria superior. S'ha vist que la capacitat per mantenir permeable la faringe es troba influenciada pels volums pulmonars. I els volums pulmonars es troben disminuïts en els pacients obesos. Resumint, l'àrea transversal de la via aèria superior dels pacients obesos amb SAHS és anormalment petita i varia considerablement amb els canvis que es produeixen en els volums pulmonars. Això predisposa a l'oclusió de la via aèria superior.

VII.4. LA SÍNDROME D'HIPOVENTILACIÓ-OBESITAT.

La primera descripció científica de la Síndrome d'Hipoventilació-Obesitat (*Obesity Hypoventilation Syndrome* o "OHS") va ser feta l'any 1955 en subjectes que presentaven obesitat, hipercàpnia crònica diürna, hipoxèmia, policitèmia, hipersòmia i insuficiència ventricular dreta (Auchincloss 1955). Inicialment es va anomenar també Síndrome de Pickwick (Burwell 1956), en honor a Fat Joe, un dels personatges del relat "The Posthumous Papers of the Pickwick Club" de Charles Dickens.

Actualment es defineix la OHS com la presència d'hipercàpnia i d'hipoxèmia diürnes en individus obesos que presenten trastorns respiratoris durant el son, en absència d'altres causes conegudes d'hipoventilació (Crummy 2008, Mokhlesi 2010). La principal manifestació clínica de les alteracions respiratòries durant el son sol ser la hipersòmia.

Així, doncs, seguint les recomanacions de l'American Academy of Sleep Medicine Task Force (AASMTF 1999) i de la més recent revisió sobre el tema (Mokhlesi 2010), les característiques avui dia acceptades que defineixen la OHS són:

- Obesitat ($BMI \geq 30 \text{ Kg/m}^2$)
- Hipoventilació alveolar crònica, que condueix a hipercàpnia diürna i hipòxia
- Alteracions respiratòries durant el son
- Exclusió d'altres causes d'hipoventilació

Entre les entitats que cal descartar abans de fer el diagnòstic de OHS trobem totes aquelles que poden cursar amb hipoventilació alveolar, com són les malalties pulmonars greus, ja sigui obstructives o restrictives, les cifoescoliosi significatives, l'hipotiroidisme greu, les malalties neuromusculars, i altres síndromes d'hipoventilació central, com poden ser els de causa congènita (Mokhlesi 2008).

En el 90% dels pacients amb OHS el trastorn respiratori durant el son que hi ha és la SAHS. El restant 10% de malalts presenta un índex d'apnees i hipopnees inferior a 5 (Mokhlesi 2010). Així, doncs, la coexistència de OHS i SAHS sol ser la norma.

La prevalença de la OHS en la població general és desconeguda. Sí que es coneix la prevalença de la OHS entre els pacients amb SAHS, que ha estat estimada entre un 10 i un 20%, éssent més alta en el subgrup de malalts amb obesitat extrema (Mokhlesi 2008).

S'han proposat diferents mecanismes per tal d'explicar la patogènia de la OHS. En primer lloc hi hauria una alteració en el control de la respiració, amb una resposta reduïda del centre respiratori a l'estímul que suposen la hipercàpnia i la hipoxèmia. També s'han implicat les anormalitats en la mecànica respiratòria provocades per la pròpia obesitat, els trastorns respiratoris durant el son, i canvis neurohormonals com la resistència a la leptina. Tal i com s'havia descrit a la SAHS, la distribució central del greix corporal ha estat identificada com un factor predisponent per a la OHS.

Però la OHS es caracteritza no solament per hipoventilació alveolar (hipercàpnia), sinó també per alteracions en la relació V/Q, com ho demostren la presència d'hipòxia diürna i l'augment del gradient alvèol-arterial d'oxigen.

La clínica de la OHS sol ser molt similar a la SAHS pel que fa als símptomes derivats de la patologia del son: roncs, hipersòmnia, apnees, cefalea matutina. Tot això en el context de pacients que són grans obesos i que presenten dispnea amb més freqüència que els malalts amb SAHS aïllada. Normalment s'arriba molt tard al diagnòstic de la OHS, sovint quan el pacient ingressa per insuficiència respiratòria hipercàpnica amb acidosi respiratòria, i són manifestes les complicacions cròniques derivades de la malaltia (poliglobúlia, cor pulmonale crònic...). Així doncs, no és infreqüent una forma de presentació greu amb necessitat de ventilació mecànica i ingrès en la unitat de cures intensives (Mokhlesi 2010).

La gasometria arterial basal serà la prova diagnòstica definitiva, que ens indicarà que existeix una hipoventilació alveolar (Mokhlesi 2008). Com s'ha mencionat més amunt, trobarem la presència d'hipercàpnia crònica, amb uns nivells de bicarbonat elevats i, freqüentment acidosi respiratòria. Una vegada confirmada la hipercàpnia s'hauran d'excloure altres causes que la justifiquin mitjançant les proves funcionals respiratòries i les proves d'imatge. Els pacients amb OHS poden tenir unes proves de funció respiratòria normals, però típicament presenten un patró restrictiu lleuger o

moderat. L'anàlisi de laboratori ens permetrà descartar la presència d'eritrocitosi i d'hipotiroïdisme.

Els malalts amb la OHS han estat tractats amb un cert grau d'èxit amb dietes per reduir el pes corporal, amb tècniques de ventilació no invasiva amb pressió positiva a la via aèria i, quan s'escau, amb oxigenoteràpia. La CPAP és el tractament fonamental en l'actualitat. En un estudi recent la BiPAP no va ser superior a la CPAP en el control de la hipersòmnia diürna, la hipoxèmia o la hipercàpnia, i tampoc va millorar l'adherència al tractament (Piper 2008). El paper de la cirurgia bariàtrica en els pacients amb OHS sembla ser prometedora. La traqueostomia va ser el primer tractament emprat amb èxit però avui dia quedaria reservada per casos molt individualitzats quan ha fracassat la teràpia amb CPAP. El teòric benefici dels fàrmacs estimulants respiratoris no s'ha confirmat encara en la pràctica clínica.

La major part dels pacients amb OHS pateixen una obesitat i una SAHS greus o molt greus. Quant al pronòstic, sembla ser que la OHS incrementa el risc de mort per sobre d'aquestes dues entitats per separat. A més, els estudis han demostrat un deteriorament important en la qualitat de vida d'aquests malalts. Són necessaris més estudis que mesurin a llarg termini el resultat de les intervencions terapèutiques i el pronòstic dels malalts amb OHS.

VII.5. OBESITAT I HIPERREACTIVITAT BRONQUIAL / ASMA.

L'asma és una malaltia inflamatòria crònica de la via aèria associada amb una obstrucció reversible de la mateixa via aèria i una resposta incrementada a una gran diversitat d'estímuls. Aquesta definició implica que podria haver una relació causal entre la inflamació de la via aèria i la hiperreactivitat bronquial. Això no obstant, és ben conegut que la inflamació de la via aèria no és l'únic mecanisme que provoca la resposta exagerada del múscul llis bronquial.

Des d'un punt de vista epidemiològic hi ha evidències que permeten establir una associació entre l'asma i l'obesitat (Jubber 2004). Sembla ser, però, que l'obesitat precedeix a l'asma i no a l'inrevés. Hi ha dades que indiquen una clara relació entre el BMI i l'asma, tant en nens com en adults, considerant l'obesitat com un factor de risc per l'asma. Els nens obesos presenten broncoespasme induït per l'exercici amb més freqüència que els no obesos. En adults, la prevalença d'asma augmenta a l'augmentar el BMI, sense que hi hagi diferències entre sexes, tal i com semblaven indicar els estudis inicials. Una recent metanàlisi de set estudis epidemiològics prospectius va mostrar que la incidència d'asma s'incrementava un 50% en els individus amb sobrepès o obesitat, i que hi havia una relació dosi-resposta entre el pes corporal i l'asma (Beuther 2007). En resum, l'obesitat pot augmentar la prevalença, la incidència i la gravetat de l'asma (McClellan 2008).

Probablement un factor clau en la relació entre l'obesitat i la hiperreactivitat bronquial sigui l'estretament de les vies aèries perifèriques que hi ha a l'obesitat (Rubinstein 1990). En pacients asmàtics, s'ha establert una clara correlació entre el caliu de la via aèria i la resposta de la mateixa a diferents estímuls. Aquesta resposta augmentada de la via aèria també ha estat confirmada en obesos, mitjançant el test de provocació de metacolina.

A més a més, la manca d'activitat física, juntament amb la incapacitat de respirar profundament, també contribueixen a l'estretament de la via aèria dels pacients obesos. Hom coneix que el patró respiratori s'associa a la hiperreactivitat bronquial.

Un altre factor que podria explicar l'associació entre l'asma i l'obesitat és la presència de fenòmens inflamatoris a totes dues malalties. Més concretament, s'ha trobat una producció augmentada d'interleucina-6 (IL-6) i ciclooxigenasa-2 per part del teixit adipós, la qual cosa podria incrementar el risc d'inflamació a la via aèria. En aquest sentit, hi ha autors que suggereixen que el component inflamatori sistèmic que caracteritza a l'obesitat pot jugar un paper fonamental en la modificació de la resposta de la via aèria dels pacients obesos (Shore 2010). Més encara, altres investigadors (Mancuso 2010), reconeixent que el teixit adipós és una font important de mediadors de la inflamació, suggereixen que les adipocines podrien influenciar i participar en la inflamació pulmonar (veure més endavant). Finalment, s'ha constatat que tant a l'asma com a l'obesitat hi ha uns nivells d'estrès oxidatiu superiors als normals. L'estrès oxidatiu podria ser un mecanisme que expliqués, en part, la fisiopatologia de la hiperreactivitat bronquial en els individus obesos (Holguin 2010). També s'ha trobat una baixa ingesta d'antioxidants en pacients asmàtics.

La presència de tos, sibilàncies i símptomes d'asma s'han atribuït altres vegades al reflux gastro-esofàgic o a trastorns respiratoris durant el son, que són entitats força freqüents en individus obesos.

En malalts obesos amb asma, la pèrdua de pes millora significativament els paràmetres de funcionalisme pulmonar, la simptomatologia respiratòria i la qualitat de vida. Alguns autors afirmen que aquesta milloria podria ser deguda, en part, a l'efecte beneficiós de la pèrdua ponderal sobre el reflux gastro-esofàgic, mentre d'altres ho atribueixen als efectes de la pèrdua de pes sobre els mediadors inflamatoris.

En resum, l'obesitat és un important factor de risc per a patir asma. A més, en els individus obesos el control de l'asma és més difícil. El tractament dietètic o quirúrgic, en aconseguir una pèrdua de pes, millora el pronòstic dels pacients asmàtics. Quant a la patogènia i als factors que puguin explicar l'associació entre totes dues entitats, darrerament es dóna més valor al component inflamatori que acompanya a l'obesitat i a l'asma.

VII.6. OBESITAT I MÚSCUL.

Nombrosos investigadors han estudiat les característiques metabòliques del múscul esquelètic a l'obesitat, sobretot quan va associada a la diabetis mellitus de l'adult (o de tipus 2) i a la resistència a la insulina. S'ha evidenciat que el teixit muscular juga un paper fonamental en el metabolisme dels hidrats de carboni i dels lípids. Tanmateix, els músculs esquelètics representen d'un 35 a un 45% de la massa corporal d'un individu. Alguns autors consideren que el múscul és el principal lloc on actua la insulina en humans, sent el teixit on es produeix del 80 al 90% de la captació ("uptake") de glucosa estimulada per la insulina (López-Soriano 2006).

Però, són relativament pocs els treballs sobre l'estructura muscular que s'han fet en individus obesos. La seva interpretació tampoc és fàcil, doncs en els diversos treballs s'han inclòs pocs pacients, o bé no s'ha fet esment a l'activitat física dels subjectes a estudi. I són ben coneguts la associació entre el sedentarisme i l'obesitat, i els efectes de la inactivitat física sobre el múscul.

No ens consta que s'hagi estudiat l'estructura dels músculs respiratoris del tòrax en individus obesos, si bé hi ha estudis de morfometria dels M. rectes de l'abdomen, en pacients sotmesos a laparotomia (Tanner 2002).

Fa anys es va suggerir que hi havia una relació entre la distribució percentual dels tipus de fibres musculars i l'obesitat (Tanner 2002). Malgrat la important variabilitat en la composició i distribució de les fibres musculars en humans, la major part d'autors han observat que els pacients obesos tenen una menor proporció de fibres de tipus I (lentes, oxidatives, més vascularitzades) en comparar-los amb els individus control. Anàlogament, el tant per cent de fibres de tipus II (de contracció ràpida, glicolítiques) és superior en els subjectes obesos que en els prims. També s'ha descrit un percentatge augmentat d'aquestes fibres de contracció ràpida en diabètics de tipus 2 i en individus amb resistència a la insulina.

El tipus de fibra muscular esquelètica determina la capacitat oxidativa però no és l'únic factor que hi influeix. Com ja hem comentat més amunt, una proporció augmentada de fibres de tipus II s'ha relacionat amb la resistència a la insulina, mentre que les fibres de tipus I serien les més sensibles a l'acció d'aquesta hormona

(Malenfant 2001). Des d'un punt de vista metabòlic, les fibres de tipus II tindrien tendència a emmagatzemar lípids (dipòsit de greix) en comptes de promoure l'oxidació lipídica. El múscul esquelètic dels pacients obesos té una menor capacitat oxidativa i un menor contingut mitocondrial. Per contra, presenta una major concentració de lípids intracel·lulars, la qual cosa s'ha associat a la resistència a la insulina (He 2001, Malenfant 2001).

Finalment, les dones amb obesitat mòrbida que presenten una proporció més alta de fibres de tipus I, aconsegueixen una reducció de pes superior quan són sotmeses a cirurgia de derivació gàstrica. Es a dir, el tractament per a reduir el pes seria més eficaç en les dones amb més fibres de tipus I (Tanner 2002).

En resum, les dades clíniques i metabòliques en subjectes obesos, semblen tenir un substracte estructural. Així, doncs, la major part dels individus obesos tenen una major proporció de fibres de tipus II a nivell del múscul perifèric, la qual cosa els condicionaria una resistència a la insulina, tot i que no és possible saber encara si aquesta relació és la causa o la conseqüència en l'evolució de la malaltia. Dades similars s'han trobat en diabètics de tipus 2.

VII.7. OBESITAT I INFLAMACIÓ.

A les pàgines precedents hem comentat la importància de l'obesitat i la comorbilitat associada, entre la que destacaven la diabetis, els problemes cardiovasculars i la SAHS. A l'analitzar les bases moleculars d'aquestes entitats trobem un substracte comú en els canvis proinflamatoris que s'han descrit a totes elles. Fóra atractiu formular una hipòtesi unificadora que considerés la inflamació com el nexa comú en la patogènia de totes aquestes malalties.

En els darrers anys s'ha revisat la relació entre l'obesitat, la síndrome metabòlica (SM) i la SAHS, considerant els canvis inflamatoris que es produeixen en aquestes entitats (Alam 2006).

VII.7.1. Teixit adipós i inflamació.

El teixit adipós té dues funcions principals:

- l'emmagatzement i l'alliberament d'energia a partir dels àcids grassos, i
- la secreció de proteïnes amb propietats endocrines i autocrines, que regulen el metabolisme energètic.

En el teixit adipós trobem adipòcits madurs, preadipòcits, cèl.lules mesenquimals i cèl.lules de l'estroma que inclouen les cèl.lules de l'endoteli vascular, els macròfags i els fibroblasts (Mancuso 2010).

Les cèl.lules del teixit greixós, bàsicament, produeixen dos tipus de proteïnes vinculades a la inflamació: citocines (produïdes pels adipòcits i pels macròfags associats al teixit adipós) i adipocines (leptina, adiponectina i resistina). També es sintetitzen altres substàncies com els reactants de fase aguda i les prostaglandines. El teixit adipós visceral és una font important de citocines proinflamatòries (TNF i IL-6) i de proteïnes antiinflamatòries (adiponectina). Les citocines més àmpliament estudiades en relació a l'obesitat han estat el TNF i la IL-6. Ambdues es troben elevades al sèrum i al teixit adipós dels pacients obesos.

La IL-6 és una citocina amb múltiples funcions que s'expressa en diferents teixits implicats en la regulació del balanç energètic, com són el greix, el múscul esquelètic i l'hipotàlem. Aproximadament el 30% de la IL-6 circulant deriva del teixit adipós. Hi ha una associació entre els nivells de IL-6 i els estats de resistència a la insulina: obesitat, tolerància disminuïda a la glucosa i diabetis de tipus 2. Més encara, la IL-6 correlaciona amb el BMI, el percentatge de greix corporal i els nivells d'insulina en dejú. Hi ha evidències que la pròpia IL-6 produïda pels adipòcits és capaç d'induir resistència a la insulina en aquestes cèl.lules. A més, s'ha vist que la reducció de pes fa disminuir la concentració plasmàtica de IL-6. L'elevació, en obesos, d'altres reactants de fase aguda, com la Proteïna C Reactiva (PCR), és deguda probablement als alts nivells de IL-6 que controla la síntesi hepàtica d'aquestes proteïnes.

VII.7.2. Adipocines i inflamació.

Les adipocines són proteïnes produïdes principalment pels adipòcits. Encara que el teixit adipós és capaç de secretar diferents substàncies, només la leptina i la adiponectina són produïdes de manera primària pels adipòcits. Per això, parlant amb propietat, només podem citar com a veritables adipocines la leptina i l'adiponectina.

VII.7.2.1. Leptina.

La principal font de leptina són les cèl.lules del teixit adipós. La leptina està codificada pel gen *ob*. La mutació en el gen *ob* o en el gen *db*, que codifica el receptor de leptina, provoca obesitat extrema, tant en ratolins com en humans. Els nivells plasmàtics de leptina es troben augmentats a l'obesitat. El rol principal de la leptina és el control de la gana. Però la leptina té funcions sobre el sistema immunològic. Les dues isoformes del receptor de leptina són expressades per múltiples cèl.lules inflamatòries. La leptina pot induir la síntesi de citocines amb capacitat inflamatòria i estimular la producció d'òxid nítric (Mancuso 2010). A nivell cel.lular pot regular la proliferació i l'activació de les cèl.lules T i protegir els limfòcits T de l'apoptosi. El dèficit de leptina s'ha associat amb una creixent sensibilitat als efectes tòxics d'estímuls proinflamatoris, com són les endotoxines i el TNF.

En l'apartat de Discussió de la present tesi tornem a parlar d'altres aspectes relacionats amb la leptina.

VII.7.2.2. Adiponectina.

De totes les adipocines circulants, la que presenta unes concentracions en plasma més elevades és l'adiponectina. Tot i que els adipòcits són la principal font d'adiponectina, els nivells sèrics d'aquesta proteïna no s'incrementen amb l'obesitat. Ans al contrari, s'observa una tendència a la disminució dels nivells d'adiponectina en individus obesos, i a un augment en l'anorèxia nervosa. Tanmateix, els pacients amb diabetis mellitus tipus 2 presenten uns nivells significativament baixos d'adiponectina. En aquesta línia, s'ha trobat una correlació directa entre la concentració d'adiponectina i la sensibilitat a la insulina. L'adiponectina presenta una activitat antiinflamatòria. S'ha vist que disminueix la producció i l'activitat del TNF. A més a més, inhibeix la producció de IL-6 i induïx l'activitat de citocines antiinflamatòries com la IL-10 i l'antagonista del receptor de IL-1 (Wulster-Radcliffe 2004).

VII.7.2.3. Resistina.

La resistina pertany a una nova família de proteïnes secretores riques en cisteïna anomenades en anglès "resistin-like molecules" (RELM) o "found in inflammatory zone" (FIZZ) proteins. Les dades disponibles suggereixen que la resistina induïx resistència a la insulina i que la hiperresistinèmia contribueix al deteriorament en la sensibilitat a la insulina en rates obeses. En humans, el mRNA de la resistina és indetectable en el teixit adipós d'individus prims però és present en el greix visceral dels obesos. Donat que la resistina s'expressa en les cèl.lules inflamatòries es pensa que podria estar implicada en els processos inflamatoris crònics associats a l'obesitat (Antje 2005). En estudis clínics els nivells de resistina estaven relacionats amb marcadors inflamatoris independentment del BMI. Ja hem comentat que la resistina és expressada en les cèl.lules mononuclears però, a més, presenta propietats proinflamatòries regulant citocines inflamatòries, probablement per la via del NF- κ B. És capaç d'induir inflamació en models animals. Per tot això, es pensa que si l'obesitat és

un estat inflamatori de baix grau on es produeix l'activació d'una cascada inflamatòria, la resistina hi podria jugar un paper rellevant.

Podriem concloure dient que l'obesitat és una malaltia complexa, crònica i multifactorial, que és el resultat a llarg termini d'un balanç energètic positiu, en el que es troben implicats tant factors genètics com ambientals. Recentment s'ha suggerit que al menys algunes formes d'obesitat estarien relacionades amb els processos d'inflamació crònica de baixa intensitat ("low grade inflammation") (Wang 2010).

A més, l'obesitat s'associa a un increment de la mortalitat, predominantment de causa cardiovascular. Hi ha una clara relació entre la inflamació sistèmica i l'aterosclerosi, que és el substrate de les malalties cardiovasculars. Actualment es considera que aquestes darreres malalties són el resultat d'una inflamació crònica a nivell de la paret vascular. Però, com ja hem comentat en el present capítol, els efectes de l'obesitat no queden reduïts a nivell de l'aparell circulatori. Per diferents mecanismes cel·lulars i moleculars la inflamació sembla ser induïda per l'obesitat i provoca alteracions a nivell metabòlic (Lumeng 2011). Recentment s'ha suggerit que podrien existir vincles entre l'obesitat i la inflamació a nivell pulmonar (Mancuso 2010).

HIPÒTESI

VIII. HIPÒTESI.

El M. intercostal extern, en tant que múscul estriat, presenta una important capacitat d'adaptació als estímuls de l'entorn. Aquesta gran plasticitat es pot manifestar de dues formes diferents en els malalts amb SAHS i OS. En ambdós casos, els repetits cicles de col.lapse de la llum de la faringe que pateixen durant la nit van acompanyats d'esforços inspiratoris creixents per tal d'obrir la via aèria superior (VAS). Aquesta activitat muscular podria suposar un veritable entrenament i provocar uns canvis estructurals similars als observats en altres músculs dels atletes o bé en els propis intercostals dels malalts amb MPOC que segueixen programes d'exercici i rehabilitació ambulatoria. Les cèl.lules musculars serien més grans (hipertrofia) i presentarien un metabolisme típicament aerobi (fibres de tipus I). Per contra, aquests esforços musculars contra càrregues durant la nit, en realitzar-se en condicions potencialment deletèries (hipoxèmia, fragmentació del son), podrien associar-se a canvis estructurals patològics. En aquest cas hom esperaria trobar fibres amb tendència a l'atròfia i amb un fenotip predominantment anaeròbic, amb una baixa tolerància a la fatiga.

D'altra banda, en els malalts amb OS és esperable un component similar al observat en pacients amb MPOC. És ben sabut que, en aquests darrers, els músculs respiratoris (MMRR) són sotmesos a càrregues més o menys continuades de quantitat moderada. Ara bé, la resposta muscular en malalts amb OS podria diferir o no respecte a la MPOC, doncs els trastorns del son podrien modular la resposta estructural i funcional dels MMRR. No tenim coneixement de quin component de la malaltia, SAHS o MPOC, pot predominar sobre el comportament dels MMRR en els pacients amb OS. Tampoc s'ha descrit si ambdues malalties presents en un mateix pacient poden suposar efectes additius que provoquin un major deteriorament de la funció i canvis més evidents a l'estructura muscular.

Tot això ens permet formular una primera pregunta d'investigació:

Es produeixen canvis estructurals a nivell del M. intercostal extern dels pacients amb SAHS i OS? Són aquests canvis diferents dels que es produeixen en pacients amb MPOC?

D'altra banda, la CPAP ha demostrat ser un tractament efectiu a la SAHS. És capaç de millorar o normalitzar, entre d'altres, els efectes neuropsicològics i cardiovasculars de la malaltia. Un tractament suficientment prolongat amb CPAP podria fer que els MMRR també manifestessin nous canvis estructurals. Tant el tamany com el fenotip de les fibres musculars del M. intercostal extern podrien patir modificacions que reflectissin una millora funcional deguda al tractament amb CPAP. La millora derivada del tractament vindria donada per un descans nocturn reparador, la supressió d'esforços inspiratoris durant la nit i una correcció de la hipoxèmia nocturna, tres factors que, sens dubte, repercuteixen en la funció i, potser, en l'estructura muscular.

Aquestes reflexions ens condueixen a formular una segona pregunta d'investigació:

És capaç la CPAP d'induir canvis morfològics ulteriors en el M. intercostal dels pacients amb SAHS i OS? Revertirà la CPAP els eventuais canvis induïts per la pròpia malaltia?

La SAHS és considerada com un estat proinflamatori. Tant a nivell local (VAS) com a nivell sistèmic s'ha descrit un augment de les cèl.lules inflamatòries i dels mediadors de la inflamació respectivament. La inflamació sistèmica associada a la SAHS també podria manifestar-se a nivell muscular, i més en concret en els MMRR, que es troben sotmesos a condicions d'estrès durant la nit. Tanmateix, està ben

documentada la resposta inflamatòria local i sistèmica a la MPOC. Més encara, hom coneix que l'exercici i la hipoxèmia són capaços d'induir una resposta inflamatòria a nivell muscular, tant a nivell cel.lular com molecular. Com ja s'ha esmentat, els MMRR dels pacients amb SAHS i OS són obligats a patir durant tota la nit unes càrregues respiratòries que podrien equiparar-se a un exercici extenuant, sota unes condicions d'hipoxèmia i d'hiperactivitat simpàtica que podrien deteriorar encara més la seva capacitat contràctil. Novament, el component MPOC present a la OS podria jugar un paper diferencial en quantitat i qualitat respecte a la SAHS aïllada.

Ens podríem plantejar, doncs, una tercera pregunta d'investigació:

Existeix una resposta inflamatòria en el M. intercostal extern dels pacients amb SAHS i OS? Si és així, es troben augmentades les cèl.lules inflamatòries a nivell d'aquest múscul? Hi ha un increment dels mediadors de la inflamació a nivell local? El component inflamatori és diferent del que es pot trobar en malalts amb MPOC o bé en obesos sense SAHS? Hi ha diferències entre els malalts amb SAHS i els pacients amb OS?

Per tant, de les anteriors preguntes d'investigació podrien derivar-se les següents hipòtesi de treball:

1.- Existeixen canvis estructurals en les fibres musculars del M. intercostal extern dels pacients amb SAHS i amb OS. Aquests canvis seran específics en cada cas i, per tant, diferents als observats en malalts amb MPOC o subjectes obesos.

2.- La CPAP, en tant que tractament efectiu de la SAHS i de l'OS, és capaç de modificar les característiques fenotípiques i el tamany de les fibres del M. intercostal extern d'aquests pacients.

3.- Els malalts amb SAHS i OS presenten una resposta inflamatòria local que, a nivell del M. intercostal extern, es manifesta amb un increment del nombre de cèl·lules inflamatòries i un augment de l'expressió de diferents tipus de mediadors de la inflamació, especialment citocines. Aquesta resposta inflamatòria tindrà característiques específiques i diferencials, tant entre aquestes dues entitats com respecte d'altres grups d'individus, com són els pacients amb MPOC o els subjectes amb obesitat sense SAHS.

OBJECTIUS

IX. OBJECTIUS.

Els objectius del present treball es poden resumir de **forma genèrica** de la següent manera:

En primer lloc, volem descriure els canvis fenotípics fibril.lars presents en un múscul respiratori característic de diferents grups d'individus amb malalties respiratòries i/o trastorns respiratoris durant el son, comparant-los amb subjectes sans (controls) i obesos no comòrbids.

En segon lloc, volem avaluar la presència d'inflamació a nivell d'aquest múscul i en els mateixos grups d'individus.

Un millor coneixement d'aquests dos fenòmens podria permetre orientar noves vies terapèutiques, tant a nivell farmacològic com de fisioteràpia.

Més concretament, els **objectius específics** es poden formular com segueix:

1.- Descriure la morfometria (tamany de les fibres i percentatges fibril.lars) del M. intercostal extern en pacients amb la Síndrome d'Apnees i Hipopnees durant el Son (SAHS) y amb l'*Overlap Syndrome* respiratori (OS).

Adicionalment, es compararan les troballes estructurals entre els dos grups de pacients a dalt esmentats i subjectes sans, individus amb obesitat (sense altres comorbilitats) i pacients amb Malaltia Pulmonar Obstructiva Crònica (MPOC).

2.- Mostrar els possibles canvis estructurals en el M. intercostal extern dels malalts amb SAHS i OS, abans i després de 6 mesos de tractament amb pressió positiva contínua a la via aèria (CPAP).

3.- Investigar la presència de cèl.lules inflamatòries (leucòcits en general i macròfags) en el M. intercostal extern d'un grup d'individus sans, uns subjectes amb obesitat i de pacients amb MPOC, SAHS i OS.

4.- A nivell subcel.lular, avaluar marcadors moleculars d'inflamació, principalment citocines, en el teixit muscular dels grups de subjectes abans esmentats.

MATERIAL I MÈTODE

X. MATERIAL I MÈTODE.

X.1. DISSENY DE L'ESTUDI.

El present estudi té dues branques:

1. Primerament s'ha realitzat un estudi transversal de casos i controls, comparant entre si les dades obtingudes de pacients amb diferents malalties (SAHS, OS i MPOC), individus obesos i subjectes completament sans.
2. En segon lloc s'ha dut a terme un estudi longitudinal, que ha avaluat l'efecte del tractament amb CPAP en pacients amb SAHS i amb OS.

A la figura X.1 es mostren les proves realitzades en el grup de pacients amb SAHS i OS, així com la cronologia de les mateixes.

El tamany de la mostra, tant pel que fa als malalts com al grup control, ha estat calculat en base als estudis previs realitzats pel nostre grup (Barreiro 2003, Barreiro 2005).

D'altra banda, l'estudi ha estat dissenyat d'acord amb les normes ètiques sobre experimentació amb éssers humans acceptades a la nostra institució (Codi de Bones Pràctiques Científiques dels centres del Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona – PRBB-, 2007) i les guies de l'Organització Mundial de la Salut en aquest camp (CIOMS/WHO, 2002). Tanmateix, el Comité d'Ètica en Investigació Humana de l'Institut de Tuberculosi i Malalties Pulmonars de Varsòvia ha aprovat tots els experiments. Aquest darrer hospital és on es van fer els procediments clínics i les biòpsies musculars, sota la nostra supervisió. Tots els individus inclosos en l'estudi han signat el consentiment informat.

X.2. POBLACIÓ D'ESTUDI.

Per a la realització de l'estudi longitudinal es van incloure de manera consecutiva 22 homes de raça blanca, caucàsics, que van acudir al Departament de Medicina Respiratòria de l'Institut de Tuberculosi i Malalties Pulmonars de Varsòvia (Polònia) amb la sospita de SAHS. A més, es van estudiar 7 subjectes obesos sense trastorns respiratoris durant el son ni altres malalties associades a l'obesitat i amb característiques antropomètriques equiparables. Dos pacients (un del grup SAHS i un altre del grup OS) han estat descartats degut a la poca qualitat de la mostra de M. intercostal, que impedia la seva correcta anàlisi.

Per completar la investigació (estudi transversal) s'han analitzat les mostres històriques (mioteca) de M. intercostal extern de pacients estudiats a l'Hospital Universitari del Mar i a la Unitat de Recerca en Múscul i Aparell Respiratori (U.R.M.A.R.) de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica de Barcelona (I.M.I.M.). Aquestes darreres pertanyen a malalts amb MPOC i a subjectes voluntaris sans, inclosos en un estudi europeu multicèntric previ i en altres protocols d'estudi (Casadevall 2007). S'han inclòs un total de 6 mostres d'individus sans i 10 procedents de malalts amb MPOC. S'han estudiat les mostres dels malalts amb MPOC que més s'apropaven a les característiques de la resta de pacients, evitant aquells MPOC de més edat i amb pitjor funció respiratòria.

X.3. CRITERIS D'INCLUSIÓ.

Han estat inclosos els pacients amb diagnòstic de SAHS aïllada o bé SAHS associada a MPOC (OS) que van acudir consecutivament a la consulta del Departament de Medicina Respiratòria de l'Institut de Tuberculosi i Malalties Pulmonars de Varsòvia. Així mateix, es van incloure en l'estudi individus amb obesitat sense comorbiditat associada, per tal de disposar d'un grup control d'obesos.

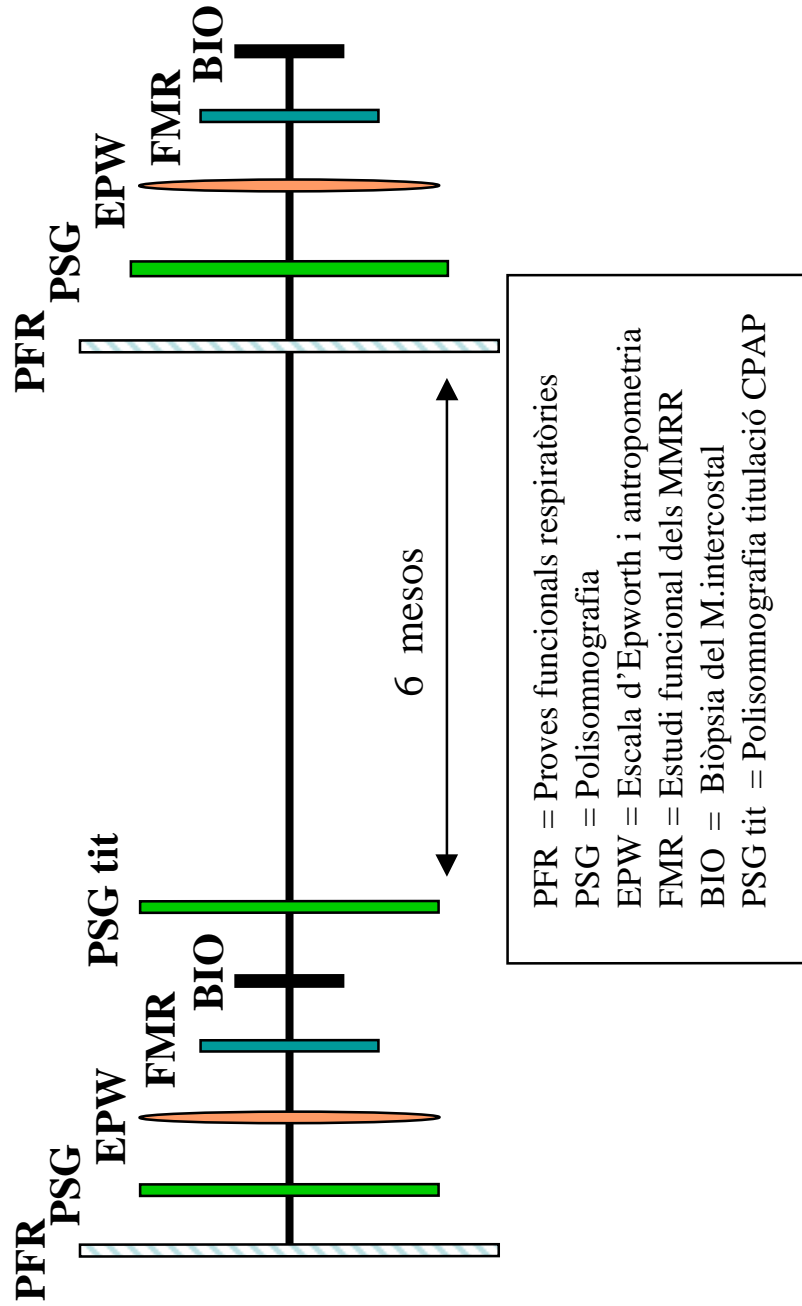
Com s'ha dit abans, per completar l'estudi de casos i controls, es van processar mostres històriques de M. intercostal extern d'individus sans i de malalts amb MPOC que havien estat inclosos en estudis previs del Servei de Pneumologia de l'Hospital Universitari del Mar de Barcelona.

X.4. CRITERIS D'EXCLUSIÓ.

Es van considerar criteris d'exclusió per a entrar a l'estudi tots aquells factors i malalties que poden modificar la funció i l'estructura muscular. Així, doncs, no van ser incloses les dones (per tal d'evitar interferències hormonals, tant generals com lligades al cicle menstrual), ni els pacients amb asma bronquial, malalties cardiovasculars, diabetis i malalties endocrinològiques cròniques, aquells amb sospita de miopatia, els que havien rebut tractament previ amb CPAP, i els tractats amb fàrmacs amb efectes coneguts a nivell muscular (corticoides, esteroides anabolitzants, estatines, levotiroxina...).

Disseny de l'estudi.

Figura X.1.



X.5. AVALUACIÓ CLÍNICA, NUTRICIONAL I FUNCIONAL DELS PACIENTS.

L'avaluació clínica de cada pacient comprenia història clínica, exploració física normalitzada, radiografies de tòrax en projeccions estàndard i electrocardiograma. La valoració de l'estat nutricional va incloure paràmetres antropomètrics i analítics.

La funció pulmonar i la força muscular (inspiratòria, espiratòria i a les mans) van ser estudiades segons les recomanacions acceptades a la literatura científica (Quanjer 1993, Black 1969, Mathiowetz 1985), i han estat tractades amb detall en treballs anteriors del nostre grup (Blanco 2003, Martínez-Llorens 2004, Coronell 2006), per la qual cosa, per tal de no ser repetitius, en el present treball no farem una descripció més exhaustiva de la metodologia emprada.

Per avaluar la funció pulmonar es va realitzar una espirometria forçada amb prova broncodilatadora, es van determinar els volums pulmonars i la resistència de la via aèria (pletismografia corporal), i es va mesurar la transferència de monòxid de carboni i es va realitzar una gasometria arterial a tots els pacients en condicions d'estabilitat clínica. Totes aquestes proves van ser efectuades segons tècniques estàndard, i utilitzant els valors de referència apropiats per a la població mediterrània (Roca 1986, 1990, 1998) i polonesa (Pellegrino 2005).

La força muscular general va ser avaluada amb un dinamòmetre de mà. La força dels músculs respiratoris es va estudiar mitjançant la determinació de la pressió inspiratòria màxima (PIM) i la pressió espiratòria màxima (PEM), emprant els valors de referència per a la població local (Morales 2007).

La tolerància a l'exercici va ser avaluada en els pacients amb SAHS i OS mitjançant la prova dels sis minuts de la marxa ("6mwd", de l'anglès *six minutes walking distance*), segons els protocols establerts.

X.6. ESTUDI DEL SON.

Es va practicar una polisomnografia nocturna convencional seguint les recomanacions de la *American Sleep Disorders Association* (American Academy of Sleep Medicine 1999).

L'estudi polisomnogràfic es va fer de nit al laboratori del son, enregistrant els següents canals:

- a) Electroencefalograma (EEG).
- b) Electrooculograma (EOG).
- c) Electromiograma del mentó (EMG).
- d) Electrocardiograma (ECG).
- e) Flux nasal-oral.
- f) Saturació d'oxigen (SaO₂).
- g) Registre dels moviments toràcics.
- h) Registre dels moviments abdominals.

Per fer el registre electroencefalogràfic es van col·locar els electrodes a nivell del vèrtex central (punts C3 y C4), utilitzant com electrodes de referència els situats en els punts A1 i A2, col·locats a nivell dels lòbuls de l'orella. Amb això es van configurar dues derivacions: C3-A2 i C4-A1.

Els moviments oculars es van registrar a partir de dos electrodes col·locats a nivell de l'angle súperoextern d'un ull i de l'angle inferoextern de l'altre.

L'electromiograma es va realitzar a nivell del mentó amb dos electrodes, un d'ells sent de referència per l'altre.

L'enregistrament de l'electrocardiograma es va obtenir a partir d'una derivació simple de dos electrodes adherits a la superfície del tòrax.

Per detectar els canvis en el flux aeri a partir de variacions de la temperatura, es va col·locar un electrode tèrmic davant del nas i de la boca.

Tanmateix, es van registrar els valors continus de la saturació d'oxigen amb un oxímetre percutani fixat a un dit. S'obtingueren dades acumulades de la SaO₂ màxima, mitjana i mínima, així com càlculs del temps per sota d'una saturació donada.

Els moviments tòraoabdominals es van medir mitjançant pletismografia inductiva (Respirace; Ambulatory Monitoring System Inc, NY, EEUU).

El diagnòstic de SAHS es va establir quan l'índex d'apnees i hipopnees (AHI) era superior a 10 per hora de son. Els malalts amb un diagnòstic de SAHS confirmat eren sotmesos a una segona polisomnografia per a conèixer el nivell òptim de Pressió Positiva Contínua a la Via Aèria (CPAP, de l'anglès *Continuous Positive Airway Pressure*), que s'ajustava de manera manual. D'aquesta forma es mesurava el nivell de CPAP necessari per eliminar les apnees, hipopnees, dessaturacions nocturnes i microdespertars electroencefalogràfics o *arousals* (Kushida 2005).

La CPAP (REMstar, Respironics[®], Murrysville, PA, EEUU) va ser aplicada a tots els pacients amb SAHS i OS durant un mínim de 6 mesos. L'adherència al tractament amb CPAP durant aquest període va ser monitoritzada mitjançant un contador present dins del mateix aparell de CPAP. Es va considerar que el pacient feia un bon compliment del tractament quan la CPAP era utilitzada més de 4 hores per nit.

La hipersòmnia diürna va ser avaluada mitjançant l'Escala de Somnolència d'Epworth (ESS, de l'anglès *Epworth Sleepiness Scale*), que va ser aplicada a tots els pacients abans de l'inici de la CPAP i després de 6 mesos de tractament. Segons la puntuació obtinguda es considera: normal < 10, límit entre 10 i 12, i somnolència excessiva > 12 (Johns 1991).

La primera biòpsia muscular es va fer de 7 a 10 dies abans d'iniciar el tractament amb CPAP, per tal d'assegurar una bona cicatrització de la ferida.

X.7. TÈCNICA PER A OBTENIR LES MOSTRES MUSCULARS.

Com s'ha comentat més amunt les biòpsies de M. intercostal extern es van fer abans i 6 mesos després de l'inici de la CPAP.

Totes les mostres es varen obtenir mitjançant biòpsia muscular a cel obert, amb una tècnica quirúrgica ambulatoria descrita i validada pel nostre grup d'investigació (Aguar 1995).

S'obtingueren totes les mostres de manera protocolitzada, en el 6è espai intercostal del costat no dominant, a nivell de la línia axil·lar anterior. El teixit muscular era processat immediatament a la pròpia sala on es realitzaven les biòpsies.

Els investigadors de l'Institut de Tuberculosi i Malalties Pulmonars de Varsòvia que van participar en l'estudi, van passar un període de formació previ a la nostra unitat de recerca (U.R.M.A.R.), per tal que la tècnica quirúrgica i el processament de les mostres fossin el més uniformes possibles.

X.7.1. Processament de les mostres musculars.

El processament inicial de les mostres dels pacients amb SAHS, OS i el grup d'obesos es va fer al Departament de Medicina Respiratòria de l'Institut de Tuberculosi i Malalties Pulmonars de Varsòvia. Les biòpsies dels malalts amb MPOC i dels subjectes sans van realitzar-se al Servei de Pneumologia de l'Hospital Universitari del Mar de Barcelona. La posterior anàlisi de totes les mostres musculars es va dur a terme al Laboratori de Biologia Cel·lular de la U.R.M.A.R. de l'I.M.I.M., amb seu al Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (P.R.B.B.).

El tamany de les mostres era, aproximadament, de 5 mm³, i cada mostra va ser dividida en fragments. Una porció va ser col·locada en isopentà i congelada en nitrògen líquid i emmagatzemada a - 70°C. Una segona part es va congelar directament en nitrògen líquid. Un altre fragment es va submergir en formaldehid al 4% a temperatura ambient. Posteriorment es va incloure en parafina per a la pràctica dels estudis de microscopia òptica convencional i d'immunohistoquímica.

X.8. TÈCNiques IMMUNOHISTOQUÍMIQUES.

X.8.1. Estudi de la morfometria.

De cada mostra es van fer talls de 3 µm de gruix amb un micròtom, variant la inclinació fins a obtenir la secció de menor àrea possible (secció transversal de la fibra muscular). Els talls transversals consecutius van ser processats per a tècniques immunohistoquímiques, utilitzant anticossos monoclonals dirigits contra les isoformes de les cadenes pesants de miosina (MyHC). La MyHC de tipus I va ser identificada utilitzant *anti-myosin heavy chain-I* (clone MHC; Biogenesis Inc., Poole, Anglaterra, Regne Unit) i la MyHC de tipus II mitjançant *anti-myosin heavy chain-II* (clone MY-32; Sigma, St. Louis, MO, EEUU).

Es van mesurar l'àrea transversal, el diàmetre menor i les proporcions de fibres de tipus I i tipus II amb un microscopi òptic (OLYMPUS, Series BX50F3; Olympus Optical Co., Hamburg, Alemanya) acoblat a una càmera fotogràfica digital (PIXERA STUDIO, Version 1.2; Pixera Corporation, Los Gatos, CA, EEUU) i a un programa de morfometria (NIH Image, Version 1.60). Es van mesurar un mínim de 100 fibres de cada biòpsia (Ramírez-Sarmiento 2002). (Figura X.2)

Per tal d'evitar la variabilitat secundària a la mesura directa de l'àrea d'una secció transversal de la fibra muscular, finalment les dades morfomètriques s'han expressat com a àrea calculada a partir del diàmetre menor, mesurada en micres quadrades (µm²). Això és degut a que aquesta darrera variable és la menys afectada per l'angle de tall. Les mesures han estat realitzades independentment per dos investigadors, amb una bona correlació interobservador.

Apart de les mesures directes de tamany cel.lular i del tant per cent de fibres de tipus I i tipus II, ens ha semblat d'interès afegir dues noves variables derivades: *l'espai ocupat relativament per les fibres tipus I i tipus II*, respectivament. Amb aquestes variables es pretén valorar el "pes específic" dels diferents tipus de fibres en un múscul determinat. Més concretament, i en el cas que ens ocupa, en el M. intercostal extern.

Així, doncs, ponderant conjuntament el tamany i el percentatge que representen respecte a les fibres totals, obtindrem l'espai ocupat per les fibres tipus I, aplicant la següent fórmula:

$$\frac{\text{àreaM1} \times \%M1}{100}$$

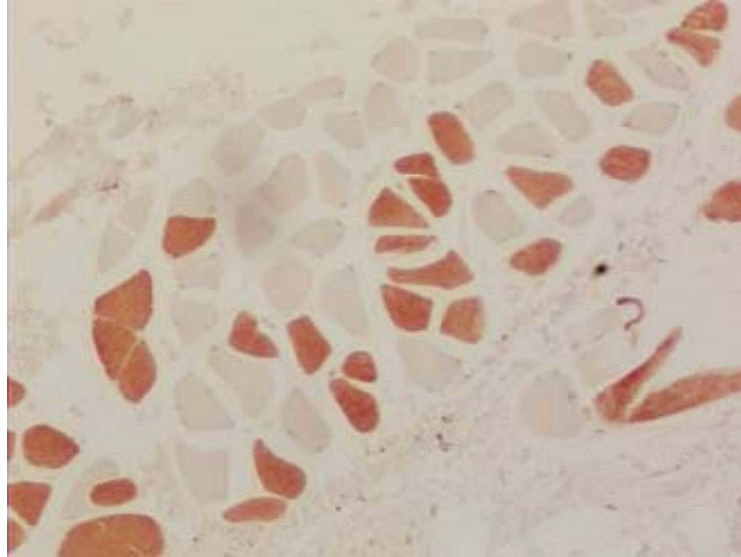
On "àreaM1" és la mitjana de *l'àrea de les fibres tipus I*, i

"%M1" és el *tant per cent de fibres tipus I*.

El mateix farem per tal de calcular l'espai ocupat per les fibres tipus II.

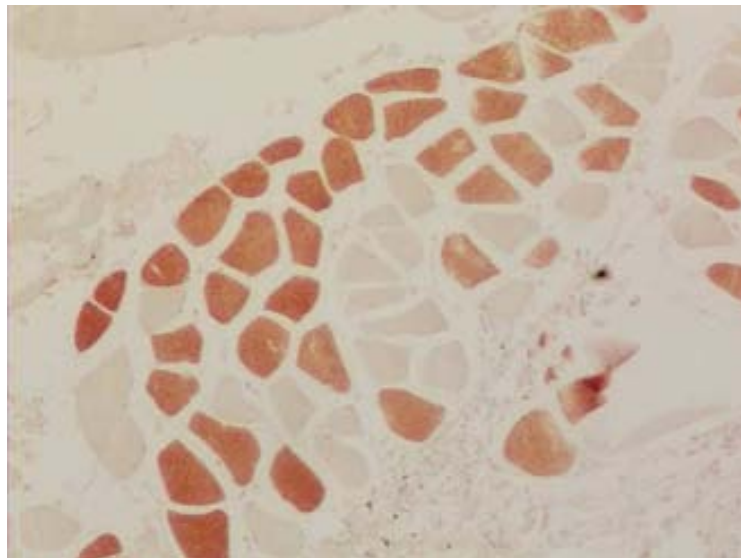
Figura X.2. Aspecte de les fibres del M. intercostal extern al microscopi (secció transversal).

a)



Fibres de tipus I (fosques) identificades mitjançant Ac.monoclonals dirigits contra les cadenes pesants de miosina (isoforma MyHC-I).

b)



Fibres de tipus II (fosques) identificades mitjançant Ac.monoclonals dirigits contra les cadenes pesants de miosina (isoformes MyHC-II).

X.8.2. Estudi del component cel.lular de la inflamació.

Amb l'objectiu d'identificar cèl.lules inflamatòries dins del teixit muscular es va practicar l'estudi immunohistoquímic amb 2 anticossos monoclonals, un dirigit contra els *leucòcits en general*, sense distingir els diferents subtipus de cèl.lules de la sèrie blanca, i un altre contra els *macròfags*.

El tractament inicial de les mostres va ser el mateix que per l'estudi morfomètric. Cada tall de múscul es va tenyir amb hematoxilina-eosina i posteriorment es va processar amb anticossos monoclonals seguint les recomanacions del fabricant. Es van escollir dos clons d'anticossos monoclonals, l'un dirigit contra l'antigen leucocitari comú (CD45) que ens permetia identificar qualsevol cèl.lula de la sèrie blanca de la sang que es trobés al múscul, i l'altre en front d'un marcador més específic de macròfags (CD68). Més concretament, els anticossos emprats van ser l'anti-CD45 (clones 2B11 & PD7/26, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EEUU) i l'anti-CD68 (clone PG-M1, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EEUU). Com a control positiu es va utilitzar teixit amigdal·lar humà.

Les mostres van ser analitzades amb el microscopi òptic (OLYMPUS, Series BX50F3; Olympus Optical Co., Hamburg, Alemanya) i, en primer lloc, es va mesurar la superfície de cada biòpsia. Es calibrava el sistema al començament de cada sessió. Es captaven les imatges amb una càmera digital (PIXERA STUDIO, Version 1.2; Pixera Corporation, Los Gatos, CA, EEUU) acoblada al microscopi i, amb el mateix *software* que utilitzàvem per a la morfometria (NIH Image, Version 1.60), mesuràvem l'àrea que ocupava cada mostra, expressada en μm^2 .

Posteriorment es procedia a identificar i quantificar el nombre de cèl.lules inflamatòries que hi havia a cada mostra de múscul. Es va realitzar un recompte manual de les cèl.lules amb el microscopi òptic a 400 augments, leucòcits i macròfags per separat. Coneixent l'àrea que ocupava cada mostra i el nombre de cèl.lules que hi havia, s'ha expressat el número de leucòcits i macròfags per mm^2 de teixit muscular.

La variabilitat en la grandària de les mostres obtingudes de M. intercostal extern, justifica que els resultats s'hagin expressat en nombre de cèl.lules per unitat de superfície (mm^2). Però, considerant que la mostra muscular no és totalment plana, sinò que té un gruix de $3 \mu\text{m}$., també es podria descriure com a nombre de cèl.lules inflamatòries en relació a la unitat de volum ($\text{cèl.lules}/\text{mm}^3$). Ja que els valors trobats han estat totalment equiparables, per tal de fer una exposició menys farragosa, en l'apartat de resultats hem optat per descriure les troballes només en forma de cèl.lules per mm^2 .

X.8.2.1. Identificació i quantificació de les cèl.lules inflamatòries.

X.8.2.1.a. Leucòcits (cèl.lules CD45+).

L'antigen leucocitari comú (LCA, de l'anglès *leukocyte common antigen*) o CD45 és una glicoproteïna transmembrana que es troba a totes les cèl.lules d'origen hematopoètic tret dels hematies i les plaquetes. S'expressa de manera important a nivell de la superfície cel.lular i permet distingir els leucòcits de les cèl.lules no hematopoètiques. El CD45 és una proteïna tirosin fosfatasa que es troba uniformement distribuïda per tota la membrana plasmàtica, i és present en els punts de contacte de les cèl.lules B i T. El CD45 és codificat per un únic gen que es troba al cromosoma 1. En els leucòcits humans s'han identificat 5 isoformes diferents de CD45. Les diverses isoformes de CD45 juguen un paper complex en les senyals de transducció dels receptors de cèl.lules T i cèl.lules B (Holmes 2005). En el present treball hem utilitzat un anticòs monoclonal específic anti-CD45 obtingut a partir de ratolins.

Mitjançant la tècnica immunohistoquímica esmentada, els leucòcits són fàcilment identificables com a cèl.lules de color marró sobre un fons basòfil i pàlid que correspon a les fibres musculars. Com es pot observar a la figura X.3, la tinció es manifesta a nivell de la membrana cel.lular, que és on es troba localitzat el LCA.

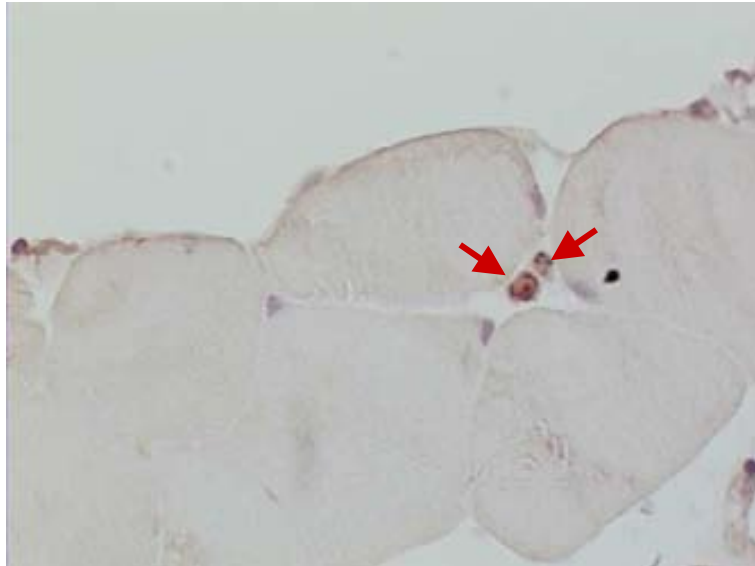
X.8.2.1.b. Macròfags (cèl.lules CD68+).

El CD68 és una glicoproteïna de 110 kD associada a la membrana dels lisosomes. Es troba, doncs, en els grànuls citoplasmàtics juntament a la lisozima i a la mieloperoxidasa, però no a la membrana cel.lular. La seva funció es desconeix, però podria estar relacionada amb els processos de fagocitosi. És considerat un marcador específic de monòcits, macròfags i histiòcits, i es continua utilitzant en la pràctica clínica per identificar els teixits que contenen aquestes cèl.lules, sent el marcador de macròfags/histiòcits més utilitzat.

Amb aquesta tinció immunohistoquímica els macròfags s'identifiquen com a cèl.lules que presenten uns grànuls citoplasmàtics de color marró sobre un fons basòfil clar (Figura X.4).

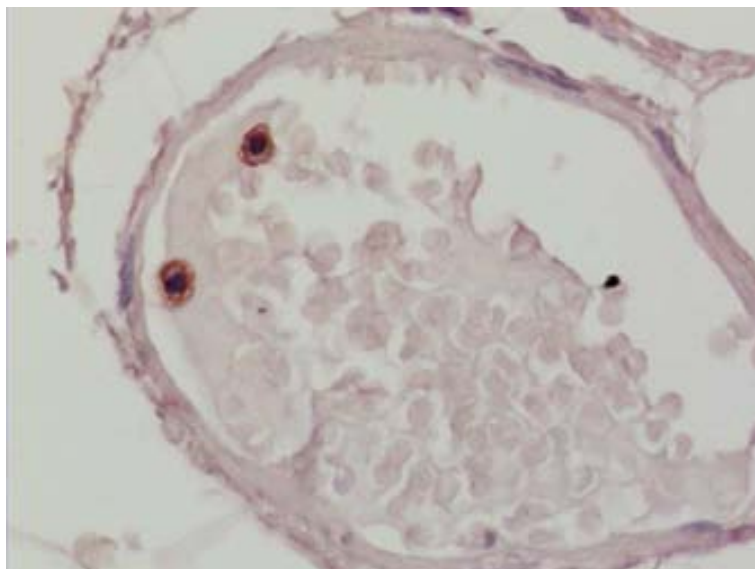
Figura X.3. **Leucòcits (cèl.lules CD45+).**

a)



Leucòcits marcats amb Ac.monoclonals en front del antigen leucocitari comú. Es troben entre les fibres musculars i es poden diferenciar dels nuclis de les mateixes. Disposició clara dins del teixit muscular.

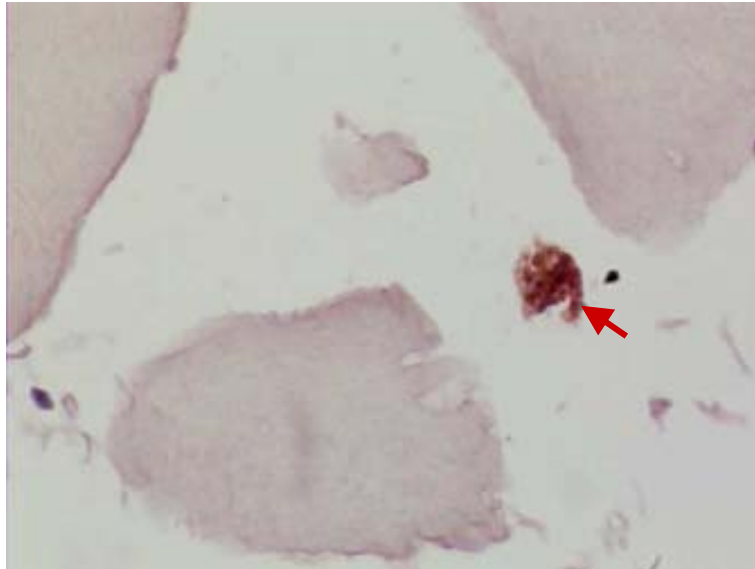
b)



Leucòcits que es troben entre les cèl.lules hemàtiques dins d'un vas sanguini. Disposició clara fora del teixit muscular.

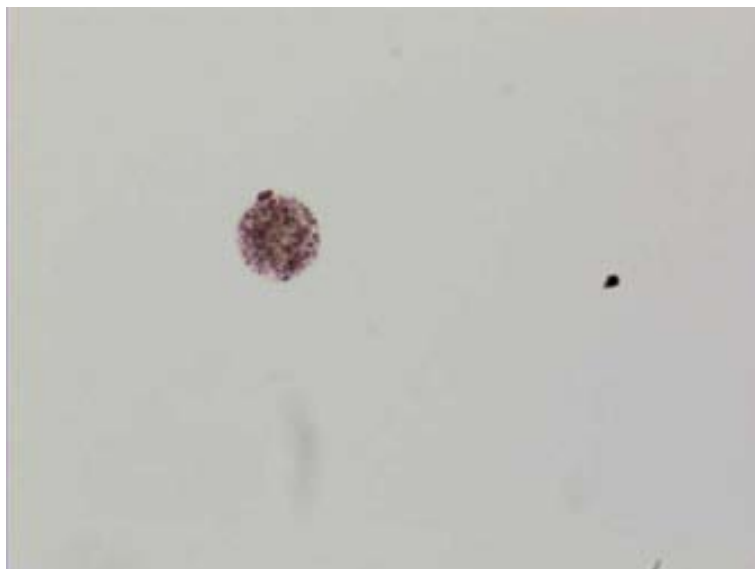
Figura X.4. **Macròfags (cèl.lules CD68+).**

a)



Macròfag marcat amb Ac.monoclonals en front de la glicoproteïna lisosomal. Es troba entre les fibres musculars i té aspecte granulat. Disposició clara dins del teixit muscular.

b)



Macròfag aïllat amb múltiples grànuls hiperpigmentats que corresponen a lisosomes. La seva llunyania de les fibres musculars fa que es consideri situat “fora” del teixit muscular i no comptabilitzat per a l’anàlisi.

X.8.2.2. Criteris utilitzats per a considerar que una cèl.lula inflamatòria es trobava estrictament en el teixit muscular.

Amb la finalitat d'evitar confusions a l'hora de fer el recompte de les cèl.lules presents a les mostres de múscul, vàrem seguir els següents criteris.

No es van considerar com a "cèl.lules inflamatòries presents en el teixit muscular" aquelles que es trobaven en el teixit conjuntiu o adipós que hi havia a la mostra. Tampoc es van comptar les cèl.lules presents a l'interior dels vasos sanguinis. Tanmateix, quan hi havia evidències d'extravasació d'hematies es considerava que en aquell lloc la biòpsia havia resultat traumàtica, i les cèl.lules blanques presents entre els hematies no es van comptar, considerant que eren de probable origen vascular directe.

Per contra, sí que es van considerar cèl.lules veritablement presents en el múscul i que, per tant, podien participar en la resposta inflamatòria local, aquelles que es trobaven entre les fibres musculars i les que, trobant-se a la perifèria d'un grup de fibres, es localitzaven a la proximitat de les mateixes.

El recompte de cèl.lules inflamatòries es va fer de manera manual, al màxim augment del microscopi òptic i per un mateix observador. Els resultats van ser contrastats per un segon observador. Això ens va permetre identificar i localitzar els leucòcits i macròfags amb precisió, evitant la variabilitat interobservador. La concordança entre les medicions dels dos investigadors va ser òptima.

X.9. TÈCNICA DE LA REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TEMPS REAL (RT-PCR).

Per estudiar l'expressió gènica de les miosines (MyHC) i de les citocines pro i antiinflamatòries s'ha utilitzat la *Reacció en Cadena de la Polimerasa amb transcripció reversa* (RT-PCR) en la seva modalitat *en temps real*, que ens ha permès quantificar el nombre de còpies d'ADN a partir de l'ARN obtingut de les mostres musculars. S'ha avaluat l'expressió d'altres proteïnes que es descriuen a la taula X.1 i a l'apartat de resultats.

X.9.1. Tècnica de la RT-PCR.

A continuació es descriu la tècnica de la RT-PCR emprada al nostre estudi.

X.9.1.1. Aïllament i purificació de l'ARN.

L'ARN total es va extreure mitjançant *TRIzol reagent* (Life Technologies). El teixit muscular (10-30 mg) es va homogenitzar en 1 ml. de *TRIzol reagent*, se li va afegir 200 µl de cloroform, es va barrejar vigorosament durant 15 seg. i es va incubar a temperatura ambient durant 10 min. Les mostres es varen centrifugar durant 15 min. (12.000 g) a 4 °C i la fase superior aquosa va ser transferida a un altre tub. Posteriorment se'ls hi va afegir un mateix volum d'isopropanol, es varen incubar durant 10 min. a temperatura ambient i l'ARN es va precipitar centrifugant durant 10 min. (12.000 g) a 4 °C. Els precipitats d'ARN es varen rentar amb 1 ml. d'etanol al 70%, es varen secar breument amb aire, es varen resuspendre en aigua lliure de RNases i es varen guardar a -70 °C. La quantitat d'ARN extret de cada mostra es va determinar mitjançant espectrofotometria.

X.9.1.2. Transcripció Reversa.

Un µg d'ARN total es va retrotranscriure mitjançant un encebador oligo(dT)₁₂₋₁₈ i transcriptasa reversa Superscript III (Invitrogen, Life Technologies SA., Grand Island, NY, EEUU) en 10 µl. de reacció, segons les instruccions del fabricant. La síntesi d'ADN complementari (ADNc) es va realitzar en un termociclador *GeneAmp PCR system 2400* (Perkin Elmer, CA, EEUU) d'acord amb el següent procediment: primer es va anilar l'encebador durant 10 min. a 70 °C, a continuació es va dur a terme la retrotranscripció durant 50 min. a 42 °C, i seguidament es va inactivar la transcriptasa reversa incubant les mostres durant 10 min. a 70 °C. Els 10 µl. de reacció es varen diluir en 50 µl. d'aigua lliure d'RNases, dels quals 1 es va utilitzar per l'amplificació de l'ADN per PCR quantitativa.

X.9.1.3. PCR a temps real.

L'amplificació de l'ADNc mitjançant PCR a temps real es va realitzar amb un *ABI PRISM 7900HT Sequence Detector* (Applied Biosystems). Per la quantificació de l'expressió dels gens es varen utilitzar assaigs predissenyats pel fabricant (*Assays-on-Demand Gene Expression Products*, Applied Biosystems) (Taula X.2). L'expressió del gen de la beta-actina es va fer servir com a control endògen per normalitzar les diferències en la quantitat d'ARN total de cada mostra. Les sondes TaqMan estaven marcades amb el colorant fluorescent FAM (6-carboxi-fluoresceïna) a l'extrem 5', i un inhibidor no fluorescent (NFQ) a l'extrem 3'. Els encebadors utilitzats per a l'amplificació estaven localitzats en diferents exons de cada gen amb l'objectiu d'evitar amplifícacions d'ADN genòmic contaminant.

Els assaigs de les mostres es varen fer per triplicat en plaques òptiques de 384 pous en un volum final de reacció de 20 µl. Les reaccions varen consistir en 1 µl. d'ADNc, 10 µl. TaqMan *Universal PCR Master Mix 2X*, encebadors a una concentració de 900 nM. cadascun, i la sonda marcada amb el colorant fluorescent a una concentració de 250 nM. La barreja de la reacció de PCR es va incubar durant 10 min. a 50 °C per eliminar possibles contaminacions amb amplicons de reaccions prèvies mitjançant la Amp-Erasa uracil-N-glicosilasa. A continuació es varen incubar durant 10 min. a 95 °C per activar l'ADN polimerasa AmpliTaq Gold. Finalment, es varen realitzar

50 cicles consistents en una desnaturalització durant 15 seg. a 95 °C i un anilament/extensió durant 1 min. a 60 °C. També es varen incloure controls negatius sense ADNc motllo.

Les dades obtingudes es varen analitzar amb el programa *Sequence Detector software version 2.1* (SDS 2.1). El gen estudi estandaritzat es va comparar amb una referència externa o mostra calibradora (un ADNc utilitzat en tots els assaigs). D'acord amb el mètode de comparació del C_T (*Threshold cycle* o cicle llindar) (Livak 2001), la mitjana de valors C_T dels gens estudi es va normalitzar amb la mitjana de valors C_T de la referència endògena (gen de la beta actina) donant lloc a ΔC_T . Posteriorment, es va restar el ΔC_T promig de la referència externa o mostra calibradora del ΔC_T promig de cada una de las mostres estudi, donant lloc a $\Delta\Delta C_T$. Finalment, el número relatiu de còpies es va determinar aplicant la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Taula X.1.**Expressió gènica de proteïnes estudiades en el present treball.**

(Avaluada mitjançant RT-PCR)

<u>Cadenes pesants de miosina:</u>	- MyHC-I - MyHC-IIa - MyHC-IIx
<u>Citocines i els seus receptors:</u>	- IL-1 - IL-6 - TNF- <i>alfa</i> - TNFr1 - TNFr2 - IL-10
<u>Estrès oxidatiu i òxid nítric:</u>	- HO-1 - iNOS - eNOS - nNOS
<u>Gens lligats al metabolisme:</u>	- Leptina

Abreviacions:

RT-PCR, Reacció en Cadena de la Polimerasa amb Transcripció Reversa; IL, interleucina; TNF-alfa, factor de necrosis tumoral alfa; TNFr1 i 2, receptors del factor de necrosis tumoral alfa 1 i 2; HO-1, hemoxigenasa I; iNOS, sintetasa de l'òxid nítric induïble; eNOS, sintetasa de l'òxid nítric endotelial; nNOS, sintetasa de l'òxid nítric neuronal; MyHC-I, -IIa i -IIx, isoformes de les cadenes pesants de les miosines adultes.

Taula X.2.-“Assays-on-Demand” (Applied Biosystems) utilitzats per les PCRs quantitatives a temps real dels gens estudiats.

Nom del gen	# Ref. de l'assaig	Exons limítrofs	Seqüència que conté la sonda (5' -3')	# d'accés al Genbank
IL-1 beta	Hs00174097_m1	5-6	TATGGAGCAACAAGTGGTGTCTCC	NM_000576
IL-6	Hs00174131_m1	3-4	ATTCAATGAGGAGACTTGCCTGGTG	NM_000600
IL-10	Hs00174086_m1	3-4	CTACGGCGCTGTCAATCGATTTCTTC	NM_000572
TNF-alpha	Hs00174128_m1	3-4	ATGTTGTAGCAAAACCCCAAGCTGA	NM_000594
TNFr1	Hs00533560_m1	1-2	CCTGCTGCTGCCACTGGTGTCTCTG	NM_001065
TNFr2	Hs00153550_m1	8-9	GAAGCCAAGGTGCCCTCACTTGCCTG	NM_001066
HO-1	Hs00157965_m1	2-3	GACGGCTTCAAAGCTGGTATGGCCT	NM_002133
iNOS	Hs01075521_m1	26-27	TTTCAGCTCAAGAGCCAGAACGGCT	NM_000625
eNOS	Hs00167166_m1	14-15	ATGGAGAGAGCTTTGCAGCTGCCCT	NM_000603
nNOS	Hs00167223_m1	18-19	GTCTTCAAAGGCAGCCTGTGATGTCT	NM_000620
MyHC-I	Hs00165276_m1	25-26	TCAAAGGAGCTTCAGGCACGCATCGA	NM_000257
MyHC-IIa	Hs00430042_m1	25-26	GTCCTCAAAGCCAAAGGGAAACCTAG	NM_017534
MyHC-IIx	Hs00428600_m1	26-27	CCTGCAAAACAGAAATCAGGTGAATAT	NM_005963
Leptin	Hs00174877_m1	2-3	ATTTCACACACGCAGTCAGTCTCCT	NM_000230
ACTB (Housekeeping)	Hs99999903_m1	1-2	TCGCCTTTGCCGATCCGCCGCCCGT	NM_001101

Abreviacions: IL, interleucina; TNF-alpha, factor de necrosis tumoral alfa; TNFr1 i 2, receptors del factor de necrosis tumoral alfa 1 i 2; HO-1, hemoxigenasa I; iNOS, sintetasa de l'òxid nítric induïble; eNOS, sintetasa de l'òxid nítric endotelial; nNOS, sintetasa de l'òxid nítric neuronal; MyHC-I, -IIa i -IIx, isoformes de la cadena pesant de les miosines adultes; Leptin, leptina; ACTB, actina beta.

X.10. ANÀLISI ESTADÍSTICA.

El valors han estat expressats com a mitjana \pm desviació estàndard (SD). La normalitat de la distribució de les variables es va avaluar mitjançant la *prova de Kolmogorov-Smirnov per a una mostra*. Les comparacions entre grups s'han fet mitjançant *l'anàlisi de la variança* (ANOVA). En casos concrets també s'han utilitzat la *prova de T per a mostres independents* quan les variables eren normals, i el test no paramètric de la "*U*" de *Mann-Whitney* quan les variables no seguien una distribució normal. Per a estudiar dades aparellades, com són els valors basals i els obtinguts després del tractament amb CPAP dins de cada grup, hem aplicat les proves de *Wilcoxon* o de la *T de Student per a dades aparellades*, depenent de la normalitat de la distribució de les variables. Hem utilitzat els *coeficients de correlació de Spearman o Pearson* per a quantificar les possibles associacions entre variables (Garrido 2002), segons la normalitat o no de la distribució de les variables. S'ha considerat sempre com a estadísticament significatiu un valor de "p" inferior o igual a 0,05.

Totes les dades s'han analitzat mitjançant el paquet estadístic *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS[®], SPSS inc., Chicago, IL, EEUU) per a Windows[®], versió 15.0.

RESULTATS

XI. RESULTATS. PART 1.**XI.1. DESCRIPCIÓ GLOBAL DE LA POBLACIÓ ESTUDIADA.**

En l'apartat de Metodologia hem descrit el disseny de l'estudi i s'ha fet esment dels diferents grups de pacients que hem analitzat en el present treball.

Finalment, s'han inclòs en l'estudi un total de 43 individus, dividits en cinc grans grups. En les properes pàgines es mostren diferents taules on es poden observar les característiques basals de tots els grups, així com les diferències que pugui haver entre ells.

XI.1.1. Característiques demogràfiques i antropomètriques.

A la taula XI.1 es mostren les principals característiques demogràfiques i antropomètriques de tots els subjectes estudiats.

XI.1.2. Funció pulmonar.

A les taules XI.2A i XI.2B es poden observar els paràmetres de funció pulmonar en situació basal i en els 5 grups d'individus analitzats en la present tesi doctoral.

XI.1.3. Funció muscular.

La força muscular perifèrica a les extremitats superiors mesurada mitjançant un dinamòmetre de mà, i la tolerància a l'exercici avaluada per la prova dels sis minuts de la marxa en els grups SAHS i OS es descriuen a la taula XI.3.

XI.1.4. Estudi del son.

Els principals paràmetres estudiats durant la polisomnografia nocturna es poden observar en les taules XI.4A i XI.4B. La primera mostra les diferències entre el grup d'obesos i els pacients amb SAHS i OS, mentre que la segona ho fa entre les dues síndromes (SAHS i OS).

Taula XI.1.1.:

Mesures antropomètriques:

	Sans n = 6		Obesitat n = 7		SAHS n = 10		Overlap n = 10		MPOC n = 10	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
Edat (anys)	45,2	7	43,5	13	42,7	7	46,8	4	46,7	4
Pes (Kg)	70,5	12	104,3 ^{***}	10	107,2 ^{***}	14	112,4 ^{***}	16	73,6	9
Alçada (m)	1,64	0,1	1,74 [*]	0,1	1,77 ^{**}	0,1	1,71	0,1	1,66	0
BMI (Kg/m ²)	26,2	3	34,5 ^{**}	3	35,7 ^{***}	4	38,8 ^{***}	5	26,8	3
Superfície corporal (m ²)	1,76	0,2	2,18 ^{***}	0,1	2,23 ^{***}	0,2	2,22 ^{***}	0,2	1,82	0,1

* p = 0,05; ** p = 0,01; *** p = 0,001

* Indica diferències significatives respecte al grup de sans

M = Mitjana

SD = Desviació estàndar

BMI = Índex de Massa Corporal

Taula XI.2A.:

Proves Funcionals Respiratòries:

	Sans n = 6		Obesitat n = 7		SAHS n = 10		Overlap n = 10		MPOC n = 10	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
PaO₂ mmHg	.	.	72,4	4	76,1	8	61,5	7	74,2	13
PaCO₂ mmHg	.	.	39,9	3	41,2	3	45,1	6	40,2	8
FEV₁ %pred	99,3	16	94,7	15	95,6	9	63,1 ^{***}	13	49 ^{***}	11
FVC %pred	97	13	90,3	12	111,4	9	85,3	12	64,6 ^{***}	11
FEV₁/FVC %	74,2	4	79,9	3	75,8	4	60,7 [*]	9	54,6 ^{**}	10
FRC %pred	89,9	17	98,7	17	148,5	51
RV %pred	106,5	16	.	.	97,1	19	126,7	27	157,9	63
TLC %pred	102,2	5	.	.	103,3	7	97,4	10	100,6	25
RV/TLC %	42,2	3	.	.	43,4	4	48,1	3	58 ^{**}	10
DLco %pred	98,3	16	.	.	117,9	21	112,8	11	81,7	18
DLco/VA %pred	88	14	.	.	92,2	11	89	10	80,2	16

* p = 0,05; ** p = 0,01; *** p = 0,001

* Indica diferències significatives respecte al grup de sans

M = Mitjana

SD = Desviació estàndar

Taula XI.2B.:

Proves Funcionals Respiratòries:

	SAHS		Overlap		MPOC	
	n = 10		n = 10		n = 10	
	M	SD	M	SD	M	SD
PaO₂ mmHg	76,1 ^{**}	8	61,5	7	74,2	13
PaCO₂ mmHg	41,2	3	45,1	6	40,2	8
FEV₁ %pred	95,6 ^{***}	9	63,1	13	49	11
FVC %pred	111,4 ^{***}	9	85,3	12	64,6 ^{**}	11
FEV₁/FVC %	75,8 ^{***}	4	60,7	9	54,6	10
FRC %pred	89,9	17	98,7	17	148,5 [*]	51
RV %pred	97,1	19	126,7	27	157,9	63
TLC %pred	103,3	7	97,4	10	100,6	25
RV/TLC %	43,4	4	48,1	3	58 [*]	10
DLco %pred	117,9	21	112,8	11	81,7 ^{**}	18
DLco/VA %pred	92,2	11	89	10	80,2	16

* p = 0,05; ** p = 0,01; *** p = 0,001

* Indica diferències significatives respecte al grup *Overlap*

M = Mitjana; SD = Desviació estàndar

Taula XI.3.:

Funció muscular i tolerància a l'exercici (prova de marxa):

	SAHS n = 10		Overlap n = 10	
	M	SD	M	SD
Mà dreta (Kg)	51,2	19	41,5	12
Mà esquerra (Kg)	54,6	15	35,3 **	10
PIM (cmH ₂ O)	137,1	35	84,6 **	31
PEM (cmH ₂ O)	163,8	47	163,9	46
6MWD (metres)	583,9	78	459,8 *	134

* p = 0,05; ** p = 0,01; *** p = 0,001

* Indica diferències significatives entre els dos grups

M = Mitjana

SD = Desviació estàndar

Mà dreta = Força a la mà dreta

Mà esquerra = Força a la mà esquerra

PIM = Pressió inspiratòria màxima

PEM = Pressió espiratòria màxima

6MWD = Prova dels 6 min. de la marxa

Taula XI.4A.:

Paràmetres del son:

	Obesitat n = 7		SAHS n = 10		Overlap n = 10	
	M	SD	M	SD	M	SD
AHI (events/h)	5	2	76,6 ^{***}	30	50,1 ^{***}	23
SaO₂ mitjana (%)	94	2	84,1 ^{***}	4	79,1 ^{***}	7
SaO₂ mínima (%)	90,2	2	63,9 ^{***}	13	61,5 ^{***}	9
T90	1,7	2	77,3 ^{***}	13	82,8 ^{***}	27
ESS	5,7	3	16 ^{***}	4	12,6 ^{**}	4

* p = 0,05; ** p = 0,01; *** p = 0,001

* Indica diferències significatives respecte al grup d'obesitat

M = Mitjana

SaO₂ = Saturació arterial d'oxigen

SD = Desviació estàndar

T90 = Temps per sota del 90% de SaO₂

AHI = Índex d'apnees-hipopnees

ESS = Escala de somnolència d'Epworth.

Taula XI.4B.:

Paràmetres del son:

	SAHS n = 10		Overlap n = 10	
	M	SD	M	SD
AHI (events/h)	76,6	30	50,1*	23
SaO₂ mitjana (%)	84,1	4	79,1	7
SaO₂ mínima (%)	63,9	13	61,5	9
T90	77,3	13	82,8	27
ESS	16	4	12,6	4

* p = 0,05; ** p = 0,01; *** p = 0,001

* Indica diferències significatives entre els dos grups

M = Mitjana

SD = Desviació estàndar

AHI = Índex d'apnees-hipopnees

SaO₂ = Saturació arterial d'oxigen

T90 = Temps per sota del 90% de SaO₂

ESS = Escala de somnolència d'Epworth.

XI.2. MORFOMETRIA MUSCULAR I EXPRESSIÓ DE LES ISOFORMES DE LES CADENES PESANTS DE MIOSINA (MyHC).

XI.2.1. Morfometria.

XI.2.1.1. Consideracions generals.

En aquest apartat descriurem l'estructura bàsica del M. Intercostal extern (percentatges de cada tipus fibril·lar i tamany de les fibres), analitzada mitjançant tècniques de morfometria i d'immunohistoquímica sobre mostres incloses en parafina. També descriurem els nivells d'expressió gènica (nombre de còpies d'àcid ribonucleic missatger –mRNA-) de les diferents isoformes adultes humanes de les cadenes pesants de miosina (MyHC de tipus I, IIa i IIx), determinades per la tècnica de RT-PCR *en temps real*.

S'han analitzat les diferències entre els diferents grups d'individus en coherència amb els objectius de l'estudi. Això implica que no s'han analitzat les comparacions entre grups que no estan contemplades en els objectius específics, com ara les que podria haver entre els pacients amb MPOC i els malalts amb SAHS, ni tampoc les diferències entre els mateixos pacients amb MPOC i els subjectes del grup control amb obesitat. Algunes d'aquestes han estat motiu d'estudis precedents.

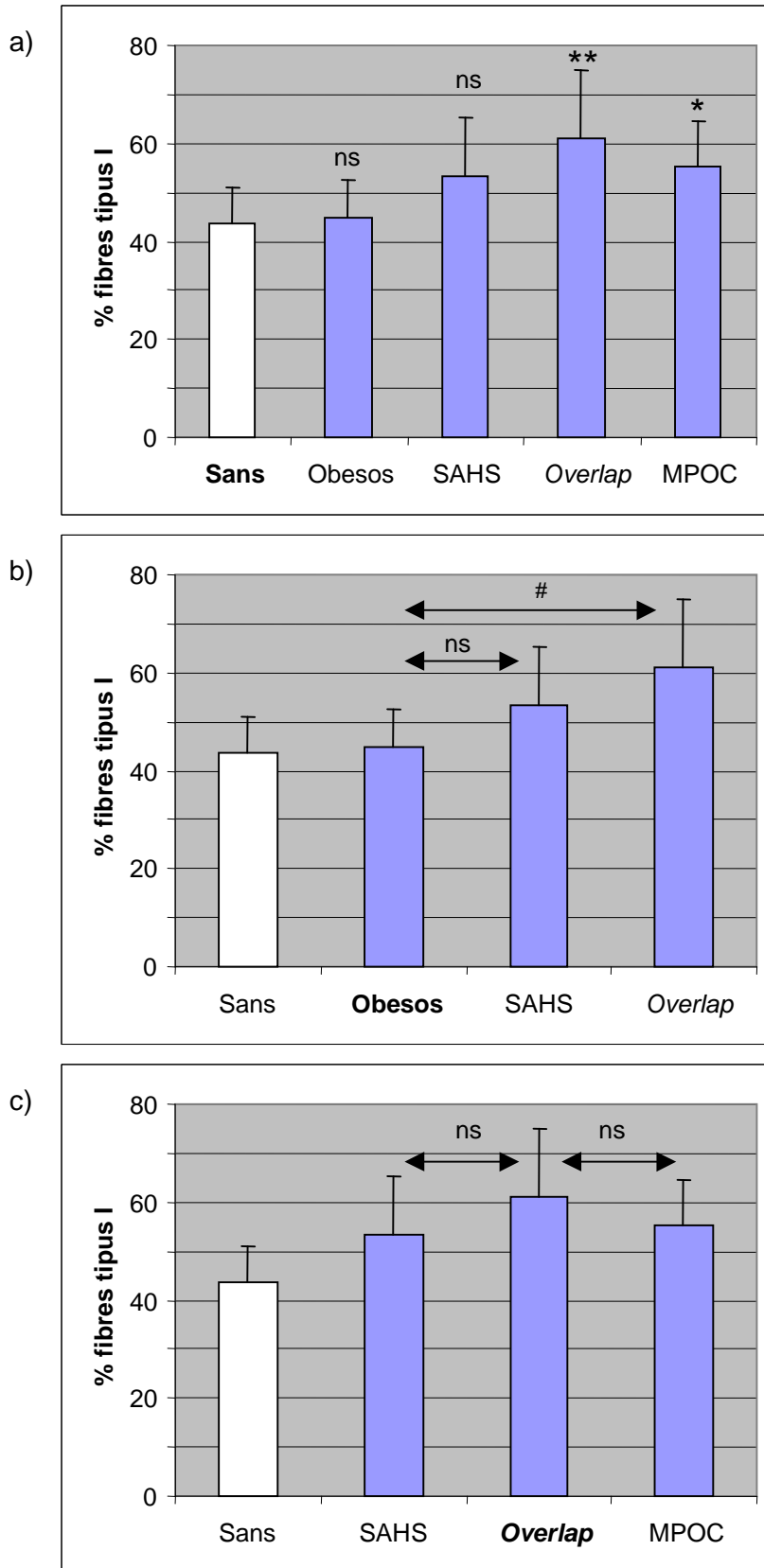
Per tal de fer una exposició més entenedora, tant el text com les figures s'han dividit en tres apartats, sempre que això ha estat possible. En el primer s'analitza *l'efecte malaltia*, comparant cada grup de pacients amb els individus sans. En el segon s'ha avaluat *l'efecte de la malaltia controlat per l'obesitat*, comparant els pacients amb SAHS i OS amb els subjectes obesos. En el darrer apartat es descriuen les comparacions entre *l'Overlap Syndrome* i les dues entitats que el contitueixen, la SAHS i la MPOC.

XI.2.1.2. Percentatges fibril.lars (fenotip fibril.lar).

Sols s'expressa el percentatge de fibres de tipus I. No s'exposarà el percentatge de les fibres de tipus II per tractar-se de dades percentuals complementàries a les primeres. Per exemple, si el percentatge de fibres de tipus I és del 25%, el de les tipus II serà del 75%.

La figura XI.1 mostra el tant per cent de fibres de tipus I del M. intercostal extern observat en els diferents grups d'individus estudiats.

Figura XI.1.



I. Efecte malaltia.a) Malalts amb MPOC.

Els M. intercostals externs dels malalts amb MPOC tenen un tant per cent de fibres tipus I superior als controls sans (55 ± 9 vs 44 ± 7 %, respectivament, $p=0,03$).

b) Pacients amb SAHS.

Hi ha una discreta tendència, que no arriba a la significació estadística ($p=0,12$), a que hi hagi més fibres de tipus I als malalts amb SAHS (53 ± 12 %).

c) Malalts amb OS.

Hi ha un major percentatge de fibres tipus I en els pacients amb OS (61 ± 14 %, $p=0,01$) que en els controls sans.

d) Subjectes OBESOS.

No hi ha diferències quant als percentatges fibril.lars entre els subjectes obesos (45 ± 7 % de fibres tipus I) i els controls sense obesitat.

II. Efecte malaltia controlat per l'obesitat.a) Pacients amb SAHS.

El tant per cent de fibres tipus I dels pacients amb SAHS mostra una tendència a ser major que el dels subjectes obesos (53 ± 12 vs 45 ± 7 %, $p=0,13$).

b) Malalts amb OS.

Els malalts amb OS tenen més fibres tipus I (61 ± 14 %, $p=0,03$) que els individus obesos.

III. *Overlap Syndrome* i els seus components.a) Pacients amb SAHS.

Comparats amb els malalts amb SAHS, en els pacients amb OS s'observa una lleugera tendència a presentar més fibres de tipus I (53 ± 12 vs 61 ± 14 %, respectivament), encara que la diferència no és estadísticament significativa ($p=0,19$).

b) Malalts amb MPOC.

No s'hi troben diferències entre els percentatges fibril.lars dels malalts amb aquestes dues entitats.

XI.2.1.3. Tamany global de les fibres.

A la figura XI.2 s'exposa el valor mitjà de l'àrea de les fibres musculars del M. intercostal extern globalment considerades, és a dir, el tamany de les fibres de tipus I i II avaluades conjuntament, expressat en micres quadrades (μm^2).

I. Efecte malaltia.

a) Malalts amb MPOC.

No trobem diferències en el tamany global de les fibres dels M. Intercostals externs.

b) Pacients amb SAHS.

El tamany de les fibres dels pacients amb SAHS té tendència a ser superior al dels controls sans ($2070 \pm 705 \mu\text{m}^2$ vs $1553 \pm 380 \mu\text{m}^2$), encara que les diferències es queden al límit de la significació estadística ($p=0,08$).

c) Malalts amb OS.

No hi ha diferències quant al tamany de les fibres entre els pacients amb OS i els individus sans.

d) Subjectes OBESOS.

Cal esmentar la tendència cap un augment en el tamany fibril·lar observada al comparar el grup d'obesos ($2262 \pm 1117 \mu\text{m}^2$) amb el de no obesos. Novament les diferències esmentades no són significatives ($p=0,16$).

II. Efecte malaltia controlat per l'obesitat.

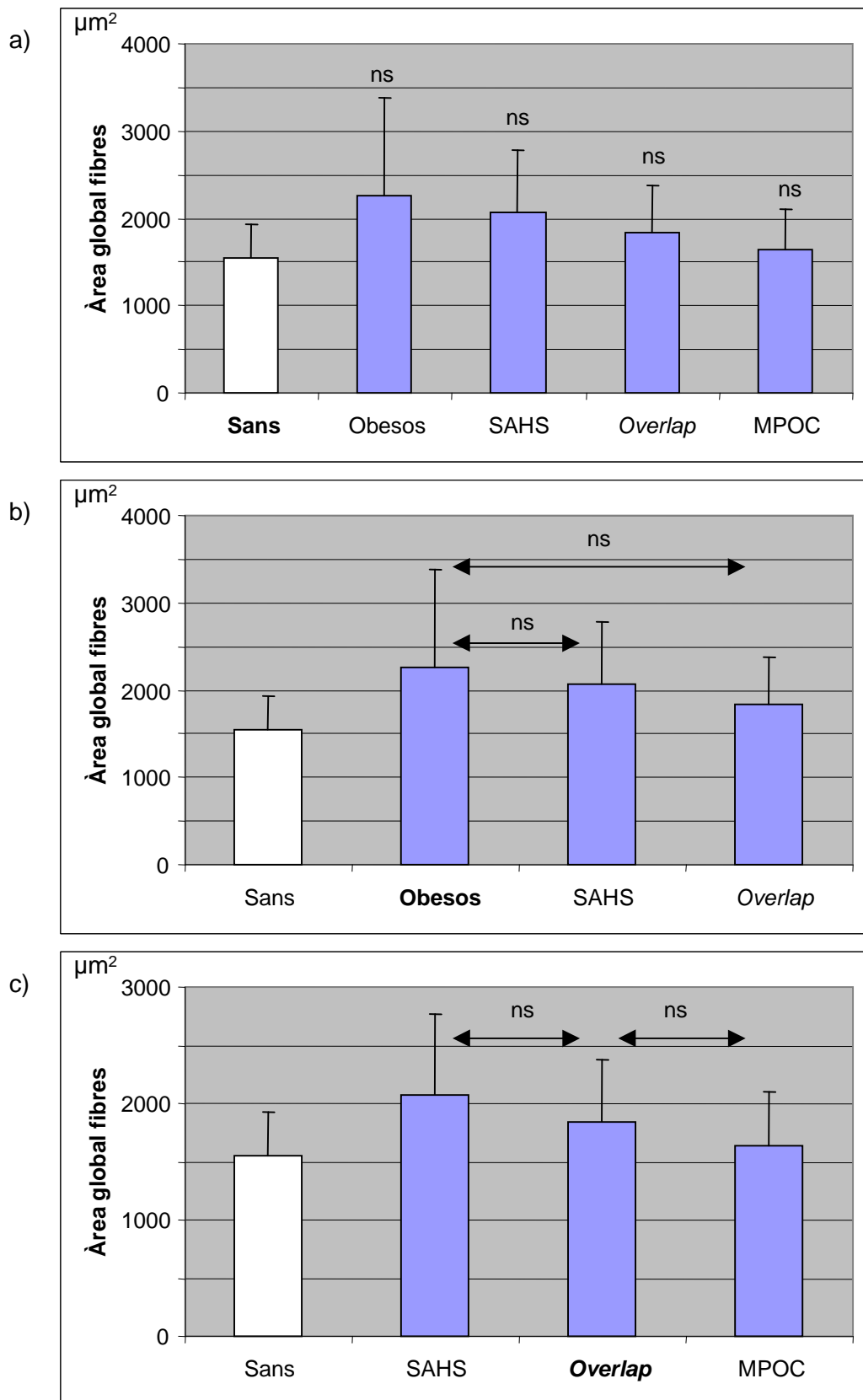
a) Pacients amb SAHS.

No hi ha diferències quant al tamany global de les fibres.

b) Malalts amb OS.

No trobem diferències significatives.

Figura XI.2.



III. *Overlap Syndrome* i els seus components.

a) Pacients amb SAHS.

Comparant els malalts amb SAHS amb els pacients amb OS no s'observen diferències quant al tamany de les fibres del M. intercostal extern.

b) Malalts amb MPOC.

No hi ha diferències en el tamany fibril.lar global.

XI.2.1.4. Tamany específic de les fibres tipus I (àrea)

A la figura XI.3 es pot observar l'àrea corresponent a les fibres de tipus I per a cadascun dels grups estudiats.

I. Efecte malaltia.

a) Malalts amb MPOC.

No hi ha diferències significatives en l'àrea de les fibres musculars de tipus I del M. intercostal extern.

b) Pacients amb SAHS.

Els malalts amb SAHS presenten una àrea de les fibres tipus I superior als controls sans ($2110 \pm 774 \mu\text{m}^2$ vs $1420 \pm 457 \mu\text{m}^2$, respectivament, $p=0,04$).

c) Malalts amb OS.

Hi ha una tendència molt marcada, en el límit de la significació estadística ($p=0,06$), a que les fibres tipus I siguin més grans als malalts amb OS ($1909 \pm 470 \mu\text{m}^2$).

d) Subjectes OBESOS.

Les fibres tipus I semblen ser més grans en els individus obesos ($2109 \pm 908 \mu\text{m}^2$). Malgrat la diferència no assoleix significació estadística, s'hi apropa força ($p=0,06$).

II. Efecte malaltia controlat per l'obesitat.

a) Pacients amb SAHS.

No hi ha diferències en les àrees de les fibres tipus I.

b) Malalts amb OS.

Les fibres tipus I dels subjectes obesos són de tamany similar a les dels pacients amb OS.

III. *Overlap Syndrome* i els seus components.

a) Pacients amb SAHS.

No es troben diferències en el tamany fibril·lar.

b) Malalts amb MPOC.

No es troben diferències en el tamany de les fibres tipus I.

XI.2.1.5. Tamany específic de les fibres tipus II (àrea)

A la figura XI.4 es pot observar l'àrea que correspon a una fibra de tipus II per a cadascun dels grups estudiats.

I. Efecte malaltia.

a) Malalts amb MPOC.

No hi ha diferències significatives respecte als subjectes sans quant a l'àrea de les fibres musculars tipus II.

b) Pacients amb SAHS.

Els malalts amb SAHS presenten una àrea de les fibres tipus II que mostra una tendència a ser més gran que la dels controls sans ($2037 \pm 680 \mu\text{m}^2$ vs $1673 \pm 369 \mu\text{m}^2$), però les diferències no assoleixen la significació estadística ($p=0,18$).

c) Malalts amb OS.

Les fibres tipus II dels malalts amb OS són de tamany similar a les dels controls sans.

d) Subjectes OBESOS.

Les fibres tipus II tenen àrees amb tendència a ser més grans que les dels controls.

Figura XI.3.

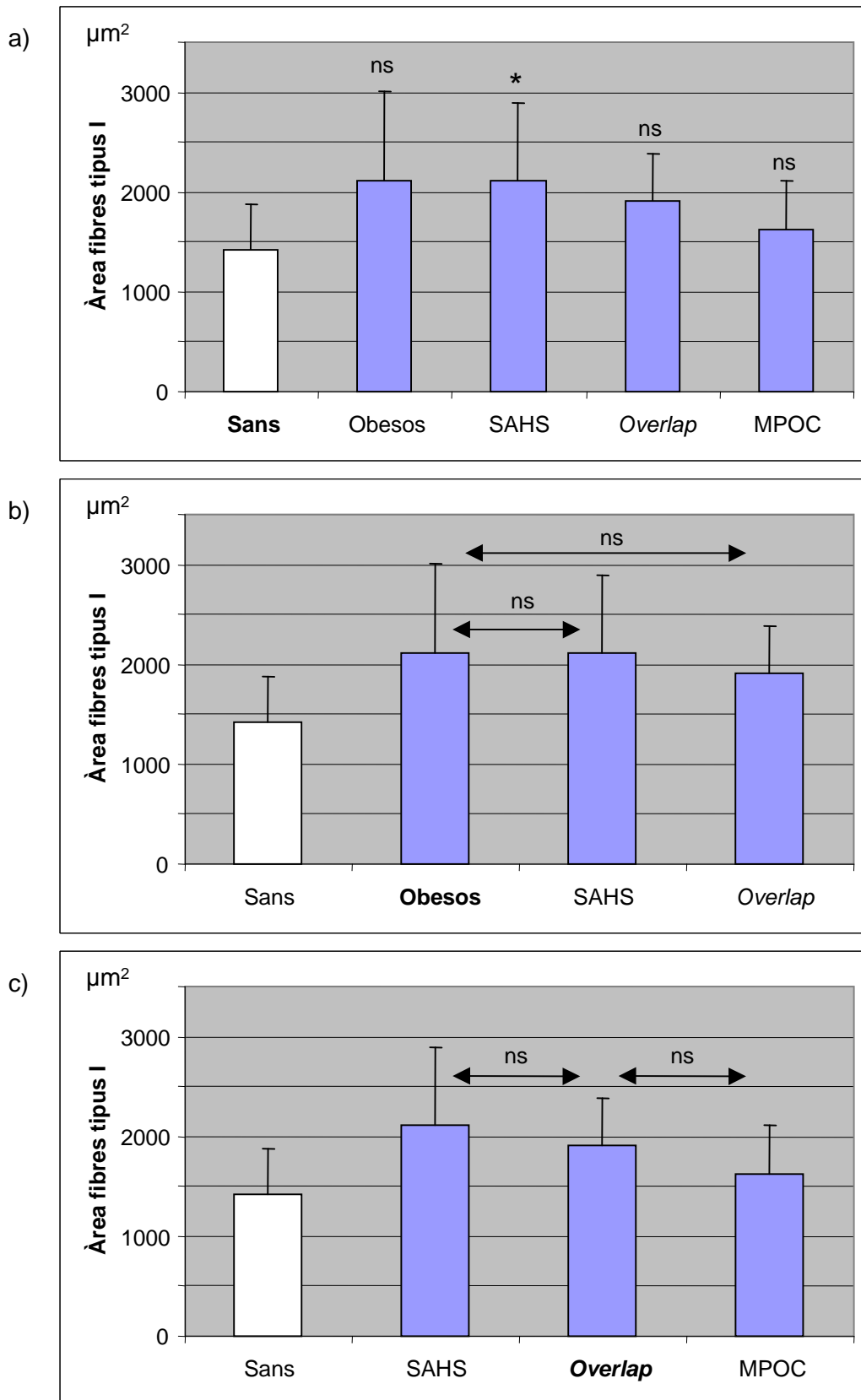
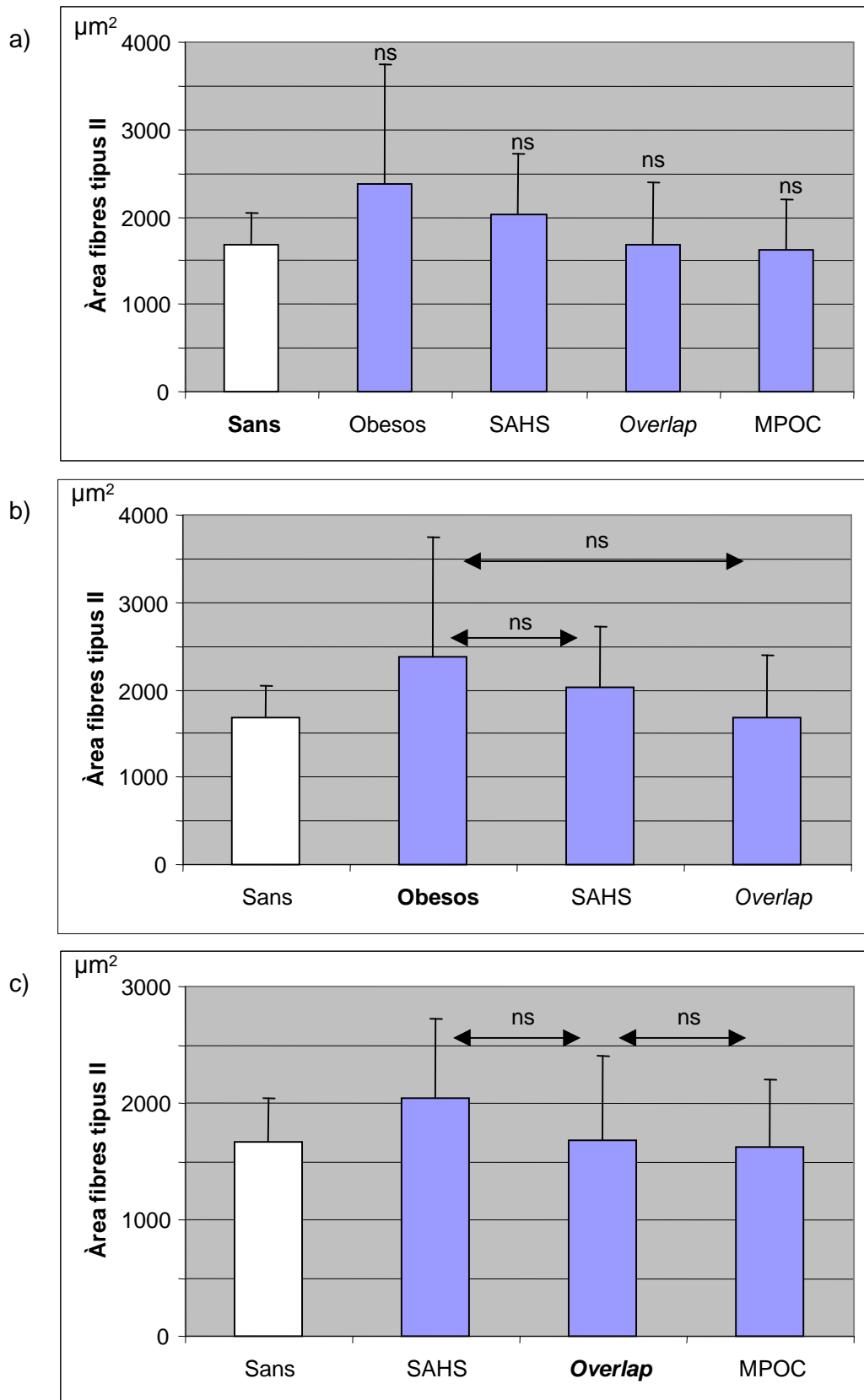


Figura XI.4.



II. Efecte malaltia controlat per l'obesitat.

a) Pacients amb SAHS.

No hi ha diferències significatives en les àrees de les fibres.

b) Malalts amb OS.

Les fibres tipus II són de tamany similar a les dels subjectes de pes semblant.

III. *Overlap Syndrome* i els seus components.

a) Pacients amb SAHS.

No es troben diferències significatives.

b) Malalts amb MPOC.

No es troben diferències en el tamany de les fibres tipus II.

XI.2.1.6. Espai ocupat per les fibres tipus I.

Tal com s'ha detallat en l'apartat de mètodes, s'ha valorat els "pes específic" de les fibres tipus I, ponderant conjuntament el seu tamany i el percentatge que representen respecte a les fibres totals.

A la figura XI.5 podem veure reflectides les superfícies calculades que corresponen a l'espai que ocuparien les fibres tipus I si valorem a la vegada la seva àrea individual mesurada i el fenotip fibril·lar.

I. Efecte malaltia.

a) Malalts amb MPOC.

Els pacients amb MPOC mostren una superfície ocupada per les fibres tipus I més gran que els controls sans ($917 \pm 349 \mu\text{m}^2$ vs $613 \pm 199 \mu\text{m}^2$, respectivament, $p=0,04$).

b) Pacients amb SAHS.

Els malalts amb SAHS presenten un àrea ($1136 \pm 553 \mu\text{m}^2$) superior als controls sans ($p=0,02$).

c) Malalts amb OS.

Hi ha una clar predomini de l'espai que ocupen les fibres tipus I en els malalts amb OS ($1155 \pm 352 \mu\text{m}^2$, $p=0,002$).

d) Subjectes OBESOS.

L'espai que ocupen les fibres tipus I dels controls obesos sembla quelcom major que el dels controls sans ($909 \pm 322 \mu\text{m}^2$ vs $613 \pm 199 \mu\text{m}^2$), si bé la diferència es queda al límit de la significació estadística ($p=0,07$).

II. Efecte malaltia controlat per l'obesitat.

a) Pacients amb SAHS.

No hi ha diferències significatives.

b) Malalts amb OS.

L'espai ocupat per les fibres tipus I del M. intercostal extern dels pacients amb OS era similar als subjectes obesos.

III. *Overlap Syndrome* i els seus components.

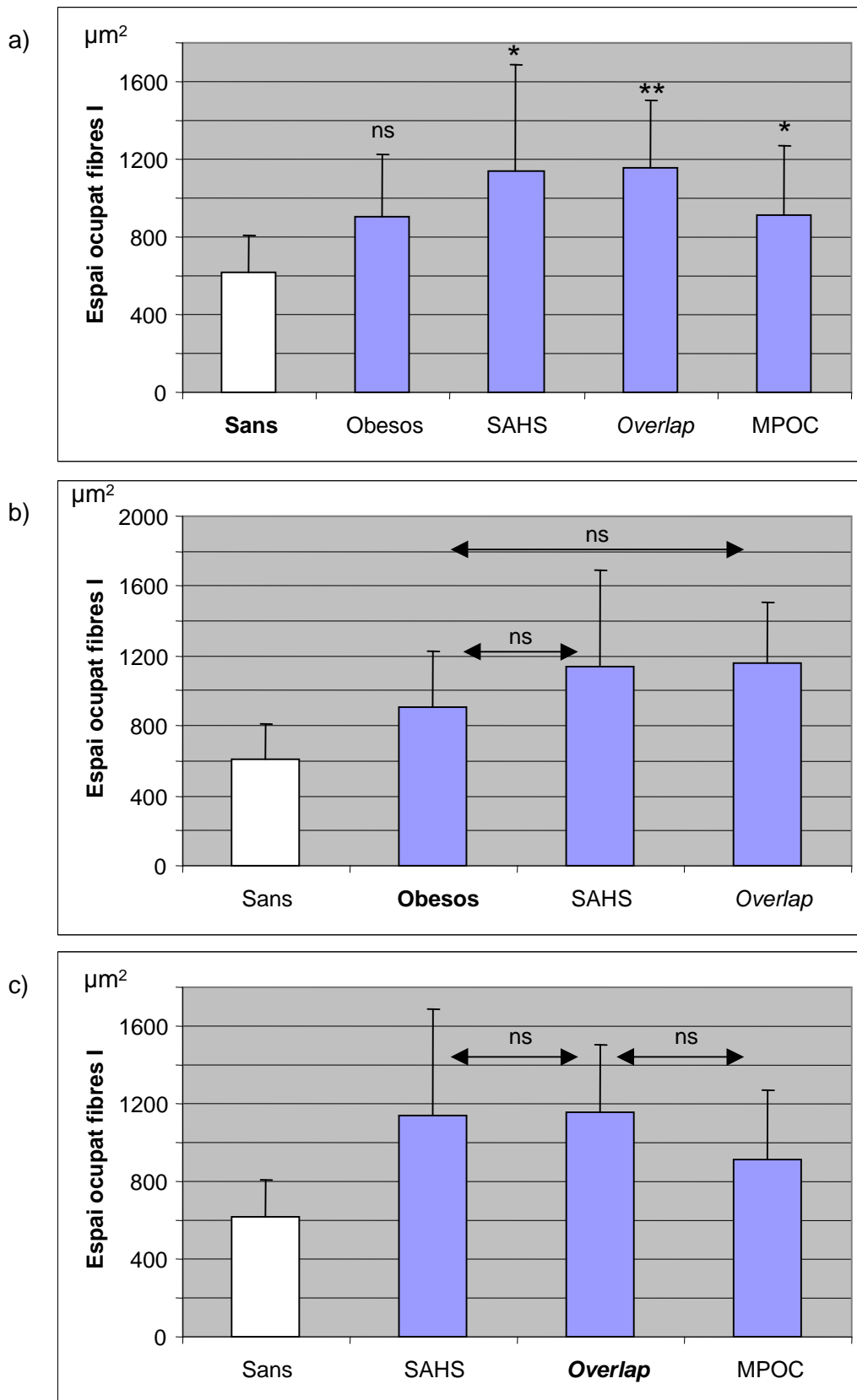
a) Pacients amb SAHS.

No es troben diferències en les àrees calculades entre els dos grups.

b) Malalts amb MPOC.

No es troben diferències significatives en l'espai ocupat per les fibres tipus I dels malalts amb aquestes entitats, si bé hi ha una lleugera tendència ($p=0.14$) a que l'esmentat espai sigui discretament superior en els pacients amb OS respecte als malalts amb MPOC ($1155 \pm 352 \mu\text{m}^2$ vs $917 \pm 349 \mu\text{m}^2$).

Figura XI.5.



XI.2.1.7. Espai ocupat per les fibres tipus II.

Novament hem valorat conjuntament el tamany de les fibres musculars i els percentatges fibril·lars en una mateixa variable, seguint els criteris de l'apartat anterior, però, en aquest cas, aplicada a les fibres tipus II.

La figura XI.6 mostra la superfície ocupada per les fibres musculars de tipus II del M. intercostal extern.

I. Efecte malaltia.

a) Malalts amb MPOC.

Malgrat no hi ha diferències significatives en el àrea calculada que ocupen les fibres musculars de tipus II dels pacients amb MPOC respecte als controls sans ($720 \pm 267 \mu\text{m}^2$ vs $940 \pm 219 \mu\text{m}^2$, respectivament), s'observa una forta tendència ($p=0,07$) que mostra que l'espai ocupat per aquestes cèl·lules musculars podria ser quelcom més petit en els malalts amb MPOC.

b) Pacients amb SAHS.

Els malalts amb SAHS presenten un àrea de fibres tipus II que no difereix dels controls sans.

c) Malalts amb OS.

Hi ha una tendència a que l'espai que ocupen les fibres tipus II dels malalts amb OS sigui inferior al dels controls sans ($686 \pm 466 \mu\text{m}^2$ vs $940 \pm 219 \mu\text{m}^2$), per bé que es queda al límit de la significació estadística ($p=0,07$).

d) Subjectes OBESOS.

L'espai que ocupen les fibres tipus II és semblant en els dos grups, amb una forta dispersió dels valors en els pacients amb sobrepes.

II. Efecte malaltia controlat per l'obesitat.

a) Pacients amb SAHS.

No hi ha diferències en les àrees calculades.

b) Malalts amb OS.

L'espai ocupat per les fibres tipus II del M. intercostal extern dels pacients amb OS és més petit que el dels controls obesos ($686 \pm 466 \mu\text{m}^2$ vs $1353 \pm 861 \mu\text{m}^2$, $p= 0,03$).

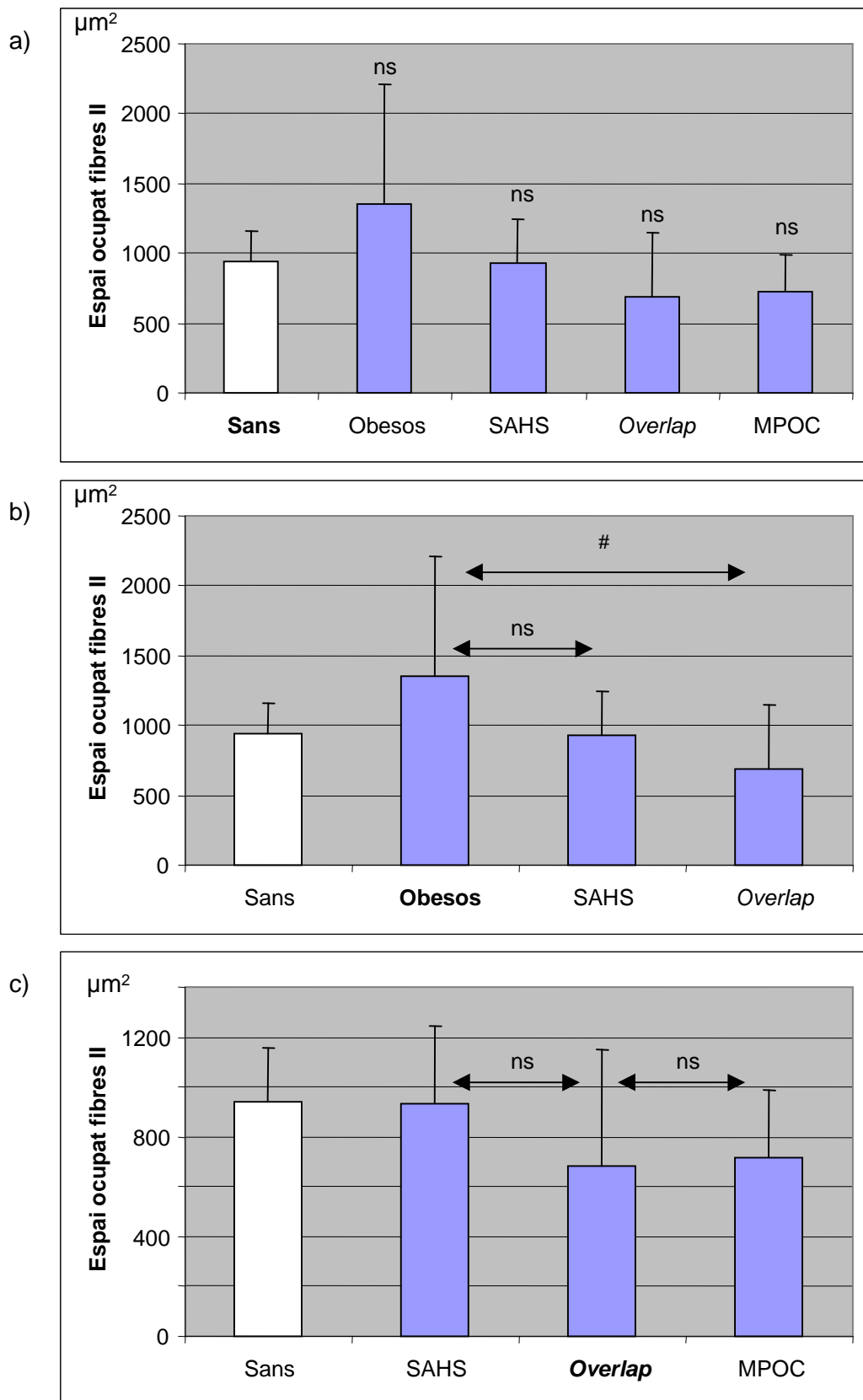
III. *Overlap Syndrome* i els seus components.a) Pacients amb SAHS.

Les diferències en les àrees calculades entre els malalts amb SAHS i els pacients amb OS, favorables als primers ($934 \pm 309 \mu\text{m}^2$ vs $686 \pm 466 \mu\text{m}^2$), es queden al límit de la significació estadística ($p=0,07$).

b) Malalts amb MPOC.

No es troben diferències significatives amb els malalts amb OS.

Figura XI.6.



XI.2.2. Expressió gènica de les cadenes pesants de miosina

Els nivells d'expressió de mRNA per a les diferents isoformes de MyHC varen ser estudiats en els cinc grups d'individus inclosos en la present tesi, tal i com s'ha explicat en l'apartat de Metodologia. En els malalts amb MPOC ja havien estat estudiats prèviament, tant pel nostre equip com per altres grups d'investigació. Es remet al lector interessat a aquestes publicacions (Casadevall 2007).

XI.2.2.1. Expressió del gen de la MyHC I.

A la figura XI.7 es pot veure l'expressió del gen de la MyHC I en els diferents grups estudiats.

I. Efecte malaltia.

a) Pacients amb SAHS.

Amb una gran dispersió de les dades individuals, no s'observen diferències amb els subjectes sans.

b) Malalts amb OS.

No hi ha diferències significatives amb els subjectes sans.

c) Subjectes OBESOS.

Els individus obesos presenten una certa tendència a una major expressió de MyHC I respecte als controls sans ($2,68 \pm 1,38$ vs $1,44 \pm 0,95$ u.a., $p=0,12$).

d) Malalts amb MPOC.

Malgrat tampoc s'evidencien diferències estadísticament significatives, els pacients amb MPOC mostren una lleugera tendència ($2,53 \pm 1,30$ u.a., $p=0,17$) a una major expressió de MyHC I que els individus sans.

II. Efecte malaltia controlat per l'obesitat.a) Pacients amb SAHS.

No s'observen diferències en l'expressió gènica de MyHC I respecte als subjectes amb obesitat.

b) Malalts amb OS.

L'expressió gènica de la MyHC I és significativament més baixa en els malalts amb OS ($1,44 \pm 0,78$ u.a., $p=0,03$) que en els subjectes obesos.

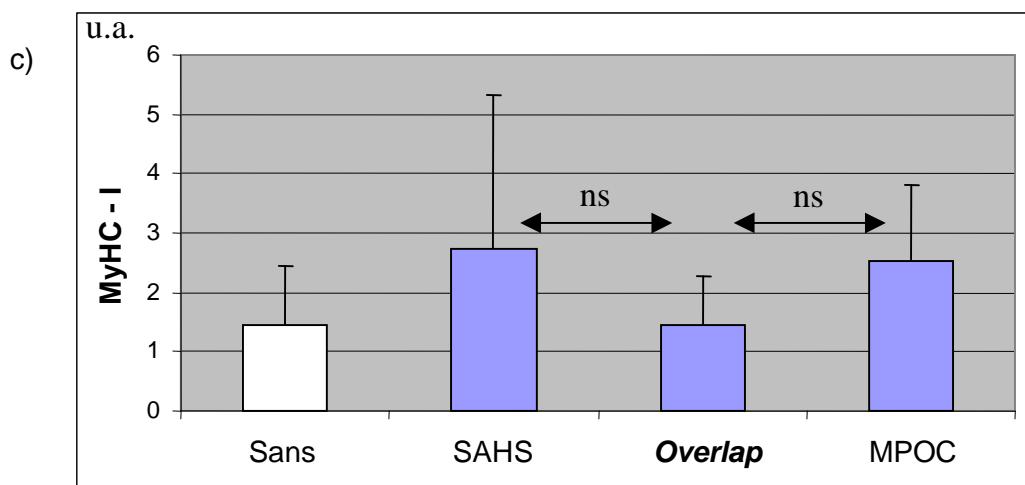
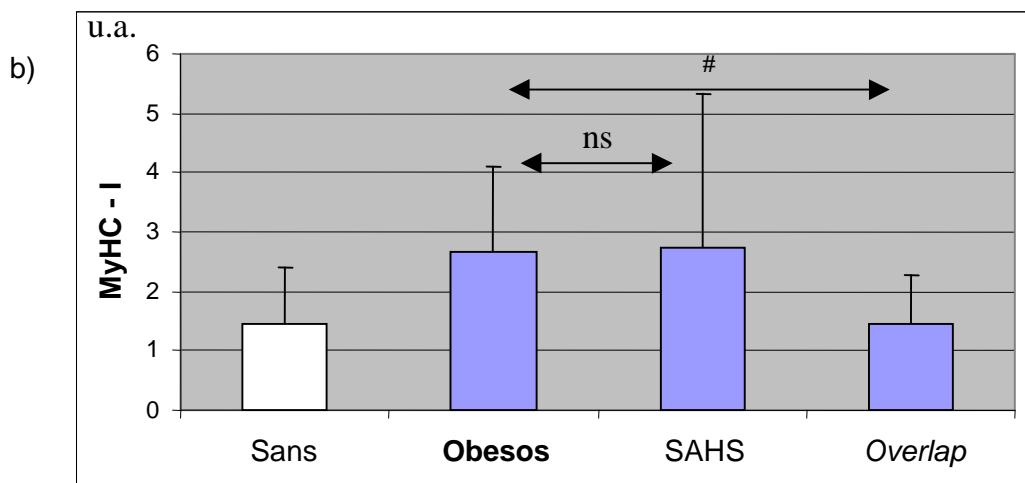
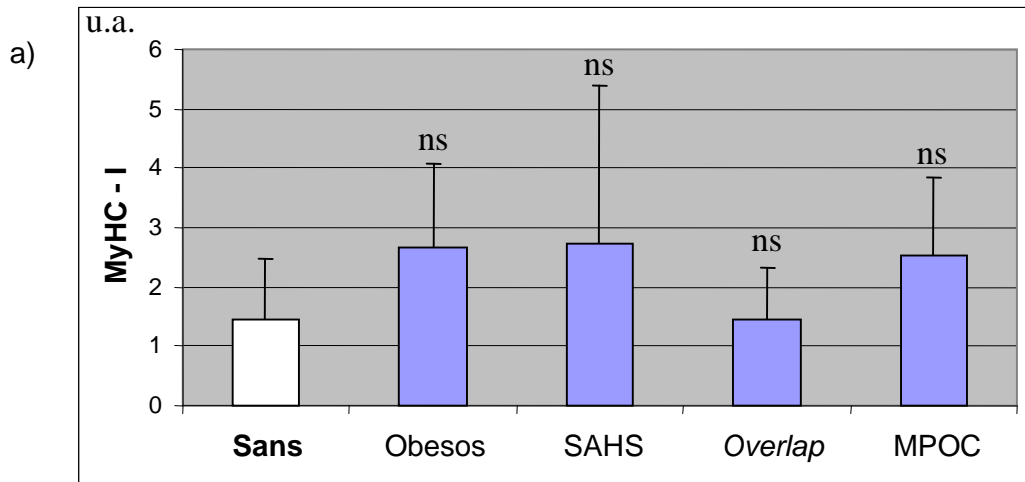
III. *Overlap Syndrome* i els seus components.a) Pacients amb SAHS.

Hem observat una certa tendència a una major expressió de MyHC I en els pacients amb SAHS ($2,72 \pm 2,70$ u.a., $p=0,16$) comparats amb els OS.

b) Malalts amb MPOC.

No s'han trobat diferències amb els pacients amb OS, si bé es cert que hi ha una tendència a una major expressió de MyHC I en el grup MPOC ($p=0,14$).

Figura XI.7.



XI.2.2.2. Expressió del gen de la MyHC IIa.

La figura XI.8 mostra l'expressió del gen de la MyHC IIa en els diferents grups estudiats.

I. Efecte malaltia.

a) Pacients amb SAHS.

S'observa una tendència a una menor expressió gènica de MyHC IIa en els malalts amb SAHS respecte als subjectes sans ($0,15 \pm 0,11$ vs $0,33 \pm 0,24$ u.a., $p=0,08$).

b) Malalts amb OS.

Hi ha una marcada tendència a una menor expressió de MyHC IIa en els malalts amb OS ($0,06 \pm 0,08$ u.a., $p=0,07$) en front als controls sans.

c) Subjectes OBESOS.

També trobem una tendència a una menor expressió de MyHC IIa en els individus amb obesitat ($0,15 \pm 0,09$ u.a., $p=0,13$) si els comparem amb els sans.

d) Pacients amb MPOC.

No hi ha diferències amb els individus sans.

II. Efecte malaltia controlat per l'obesitat.

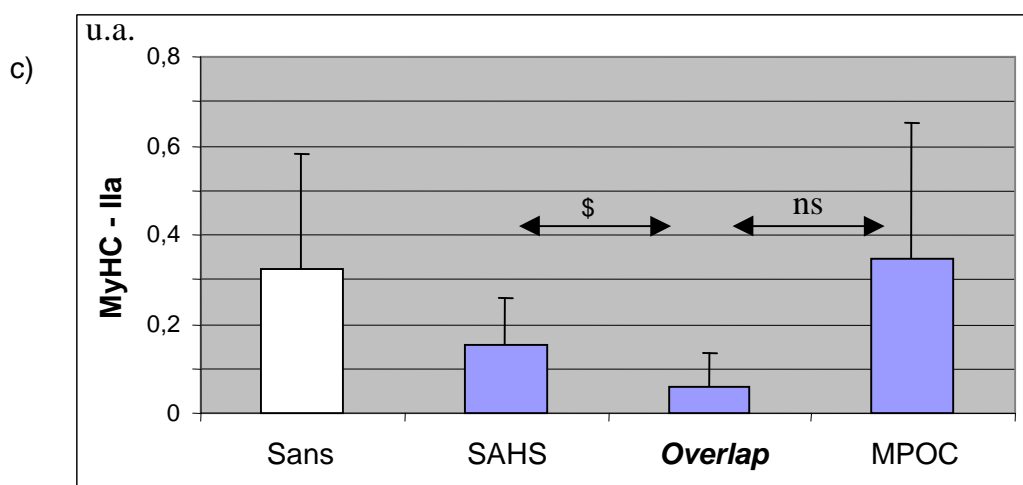
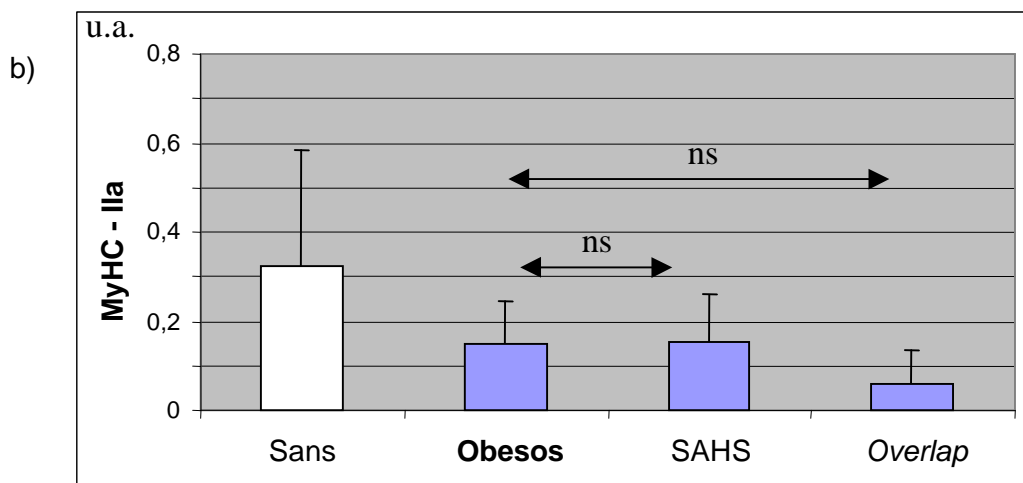
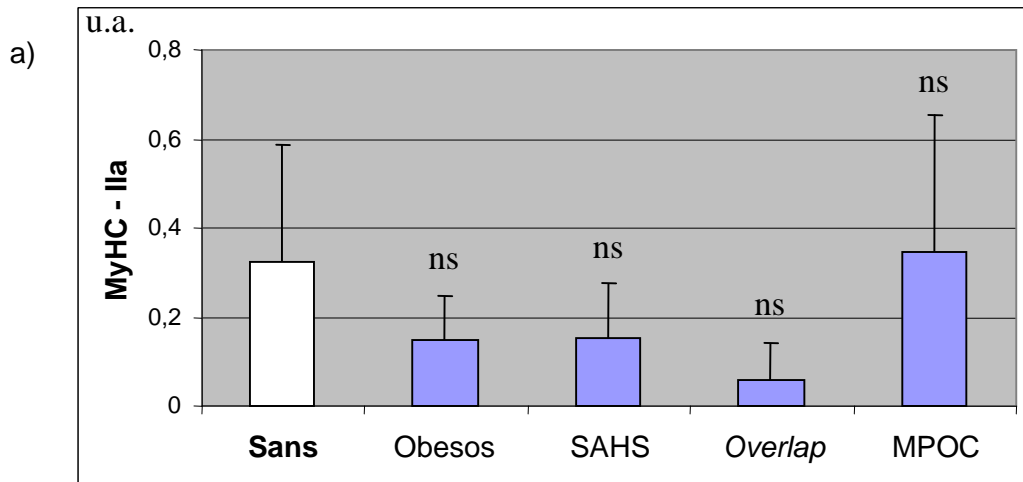
a) Pacients amb SAHS.

No trobem diferències en l'expressió de MyHC IIa entre el grup SAHS i els subjectes obesos.

b) Malalts amb OS.

En els pacients amb OS hi ha una forta tendència a una menor expressió gènica de MyHC IIa respecte als individus obesos ($p=0,06$).

Figura XI.8.



III. *Overlap Syndrome* i els seus components.

a) Pacients amb SAHS.

Els malalts amb SAHS presenten una major expressió de MyHC IIa quan són comparats amb els pacients amb OS ($p=0,04$).

b) Malalts amb MPOC.

Els pacients amb MPOC mostren una forta tendència ($0,35 \pm 0,31$ u.a., $p=0,07$) a una major expressió de MyHC IIa respecte als malalts amb OS.

XI.2.2.3. Expressió del gen de la MyHC IIx.

A la figura XI.9 es pot veure l'expressió del gen de la MyHC IIx en els diferents grups estudiats.

I. Efecte malaltia.

a) Pacients amb SAHS.

Els pacients amb SAHS tenen una expressió de MyHC IIx significativament més baixa que els controls sans ($0,15 \pm 0,10$ vs $0,98 \pm 0,43$ u.a., $p=0,01$).

b) Malalts amb OS.

Els malalts amb OS presenten una menor expressió gènica de MyHC IIx en els seus M. intercostals externs ($0,06 \pm 0,06$ u.a., $p=0,008$).

c) Subjectes OBESOS.

En els subjectes obesos també trobem una menor expressió de MyHC IIx ($0,24 \pm 0,13$ u.a., $p=0,02$).

d) Pacients amb MPOC.

Tanmateix, els malalts amb MPOC presenten una menor expressió gènica de MyHC IIx ($0,23 \pm 0,39$ u.a., $p=0,01$) que els individus sans.

II. Efecte malaltia controlat per l'obesitat.a) Pacients amb SAHS.

Observem una discreta tendència ($p=0,16$) a una menor expressió gènica de MyHC IIx en els malalts amb SAHS respecte als subjectes obesos.

b) Malalts amb OS.

Els malalts amb OS presenten una menor expressió gènica de MyHC IIx que els subjectes obesos ($p=0,002$).

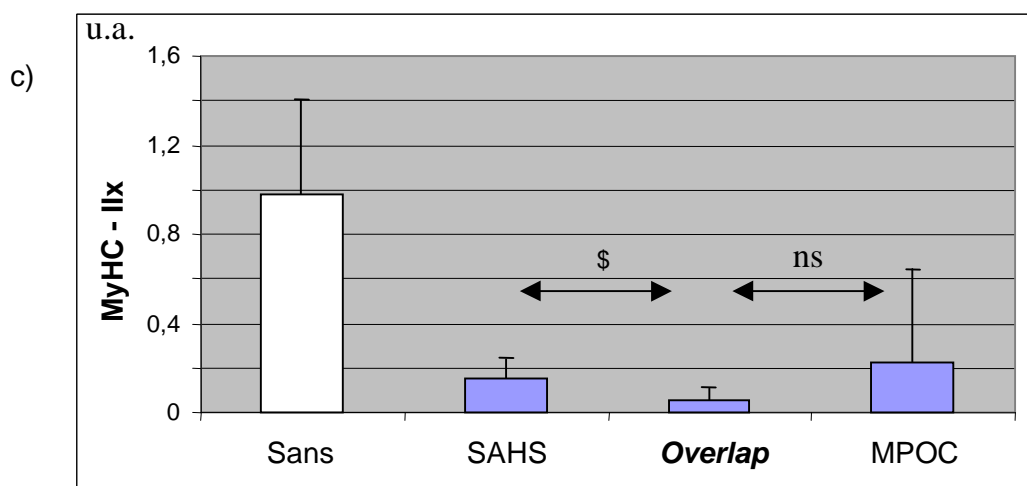
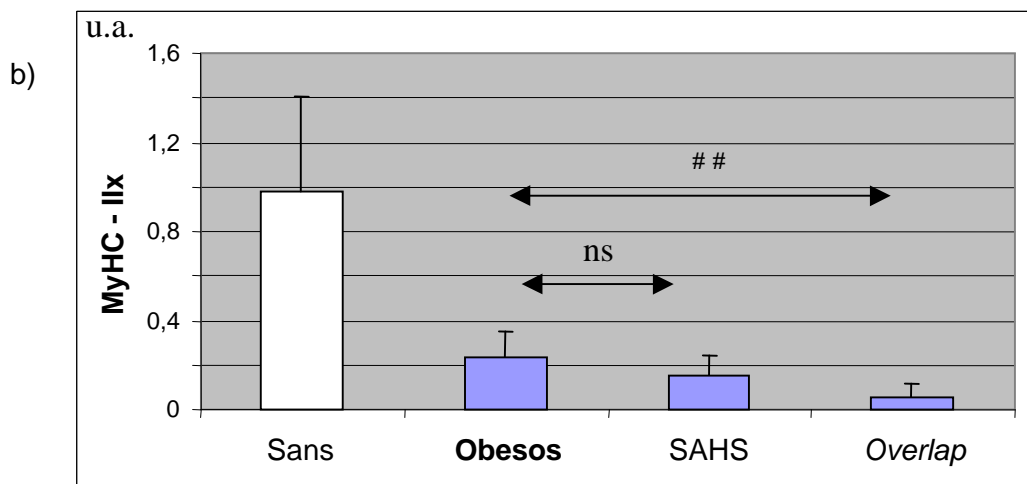
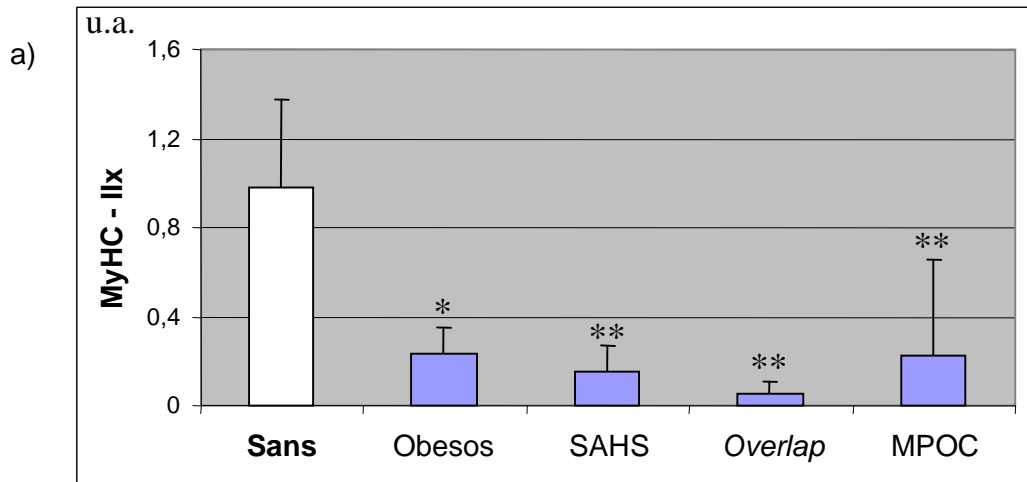
III. *Overlap Syndrome* i els seus components.a) Pacients amb SAHS.

A l'igual que passava amb la MyHC IIa, els malalts amb SAHS presenten una major expressió gènica de MyHC IIx que els pacients amb OS ($p=0,02$).

b) Malalts amb MPOC.

No hi ha diferències amb els pacients amb OS.

Figura XI.9.



XI.3. RESULTATS INFLAMACIÓ.

XI.3.1. Consideracions generals.

En aquest apartat s'analitzarà la presència de cèl.lules inflamatòries en el M. intercostal extern avaluada, com ja s'ha comentat a l'apartat de Metodologia, mitjançant tècniques d'immunohistoquímica sobre mostres incloses en parafina. Els anticossos monoclonals testats anaven dirigits contra les glucoproteïnes CD45 (antigen leucocitari comú) i CD68 (antigen específic dels macròfags). També descriurem els nivells d'expressió gènica (mRNA) de diferents citocines pro i antiinflamatòries, i d'alguns receptors de citocines, determinats per RT-PCR *en temps real*.

XI.3.2. Identificació de cèl.lules inflamatòries.

En el text, per tal de fer una exposició menys farragosa, hem optat per exposar els resultats en forma de nombre de cèl.lules per unitat de superfície (mm^2). A les figures XI.10 i XI.11 es presenten el nombre de leucòcits/ mm^2 i de macròfags/ mm^2 respectivament. Ja s'ha comentat amb anterioritat (Metodologia) que els resultats han estat totalment equiparables quan el nombre de cèl.lules inflamatòries han estat analitzades en relació a la unitat de superfície (cèl.lules/ mm^2) o de volum (cèl.lules/ mm^3) de la mostra muscular.

És de destacar que en tots els grups estudiats hi ha cèl.lules inflamatòries, fins i tot en els individus sans. És a dir, en cap mostra de teixit analitzat hem trobat "zero" cèl.lules inflamatòries. Dit això, cal precisar que aquesta presència de cèl.lules inflamatòries és molt lluny de semblar-se a un infiltrat cel.lular inflamatori, fàcilment identificable amb el microscopi òptic.

XI.3.2.1. Presència de leucòcits (cèl.lules CD45+).

Mitjançant aquesta tècnica d'immunohistoquímica hem identificat globalment les cèl.lules de la sèrie blanca que hi havia en la mostra muscular.

La figura XI.10 mostra el nombre de leucòcits per mm² de teixit muscular que hi ha en el M. Intercostal extern dels diferents grups d'individus.

I. Efecte malaltia.

a) Malalts amb MPOC.

Els M. Intercostals externs dels malalts amb MPOC presenten un major nombre de leucòcits que els subjectes sans ($1,66 \pm 1,21$ vs $0,73 \pm 0,26$ cèl.lules/mm², $p=0,04$).

b) Pacients amb SAHS.

Els pacients amb SAHS tenen més leucòcits en el teixit muscular dels seus M. intercostals externs ($2,30 \pm 0,64$ cèl.lules/mm², $p<0,001$) que els controls sans.

c) Malalts amb OS.

Els M. Intercostals externs dels malalts amb OS també tenen més leucòcits ($3,27 \pm 1,01$ cèl.lules/mm², $p<0,001$) que els subjectes sans.

d) Subjectes OBESOS.

També els individus obesos mostren una moderada tendència a tenir més cèl.lules inflamatòries de la sèrie blanca ($1,31 \pm 0,65$ cèl.lules/mm², $p=0,08$) que els subjectes sans.

II. Efecte malaltia controlat per l'obesitat.

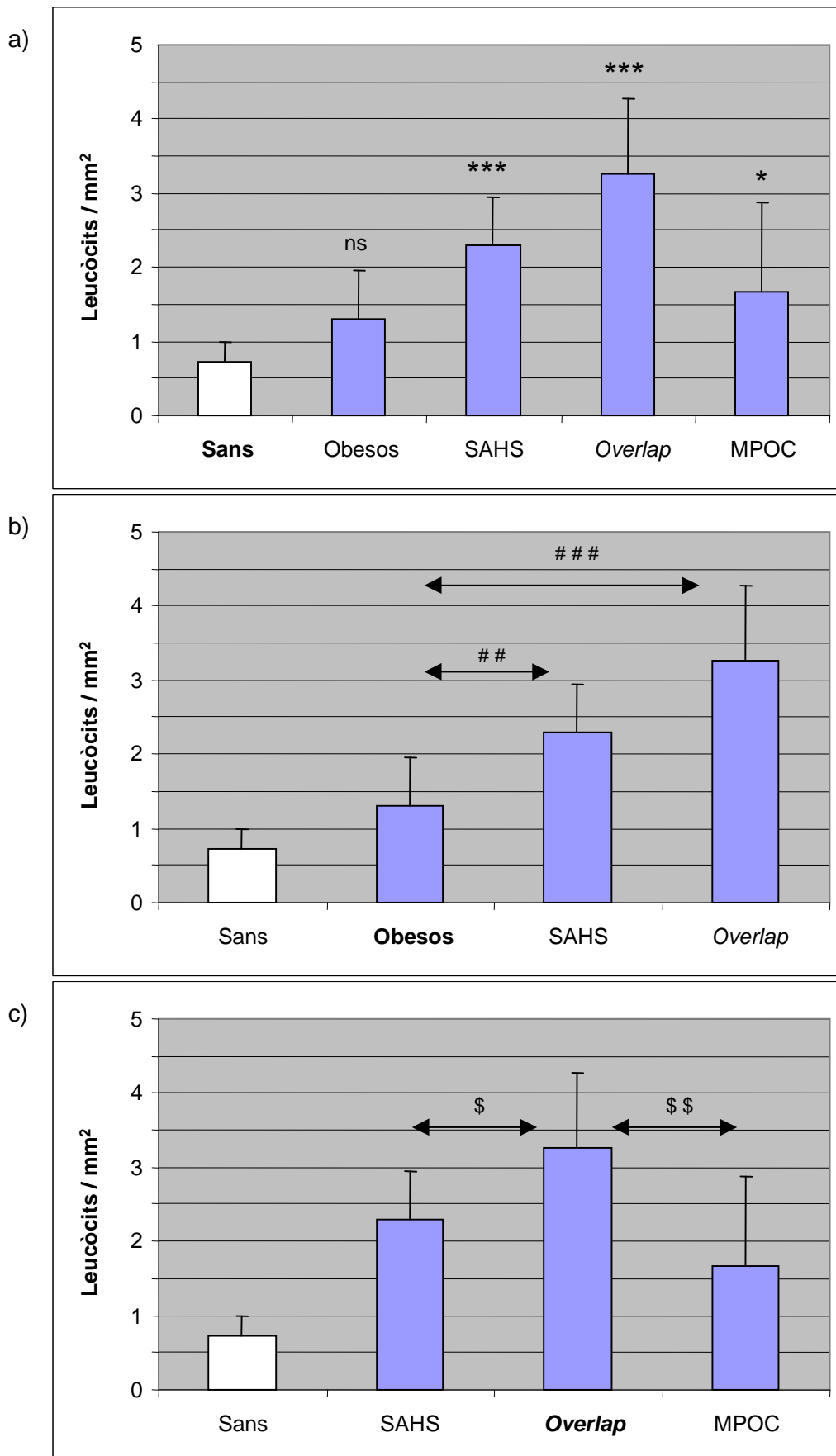
a) Pacients amb SAHS.

Els pacients amb SAHS tenen un major nombre de leucòcits que els subjectes obesos ($p=0,01$).

b) Malalts amb OS.

Igualment, els malalts amb OS tenen més leucòcits que els individus obesos ($p<0,001$).

Figura XI.10.



III. *Overlap Syndrome* i els seus components.

a) Pacients amb SAHS.

Els M. intercostals externs dels malalts amb OS tenen més leucòcits que els pacients amb SAHS ($p=0,02$).

b) Malalts amb MPOC.

Els pacients amb OS també tenen un M. intercostal extern amb un major nombre de leucòcits que els malalts amb MPOC ($p=0,005$).

XI.3.2.2. Presència de macròfags (cèl.lules CD68+).

Utilitzant aquesta tècnica d'immunohistoquímica hem identificat de forma específica els macròfags que hi havia a la mostra muscular analitzada.

La figura XI.11 mostra el nombre de macròfags per mm^2 de teixit muscular que hi ha en el M. Intercostal extern dels diferents grups d'individus estudiats.

I. Efecte malaltia.

a) Malalts amb MPOC.

S'observa una lleugera tendència a una major presència de macròfags en els M. intercostals dels pacients amb MPOC si els comparem amb els controls sans ($1,55 \pm 0,66$ vs $0,91 \pm 0,69$ cèl.lules/ mm^2 , $p=0,13$).

b) Pacients amb SAHS.

No hi ha diferències amb els controls sans quant al número de macròfags en els M. intercostals.

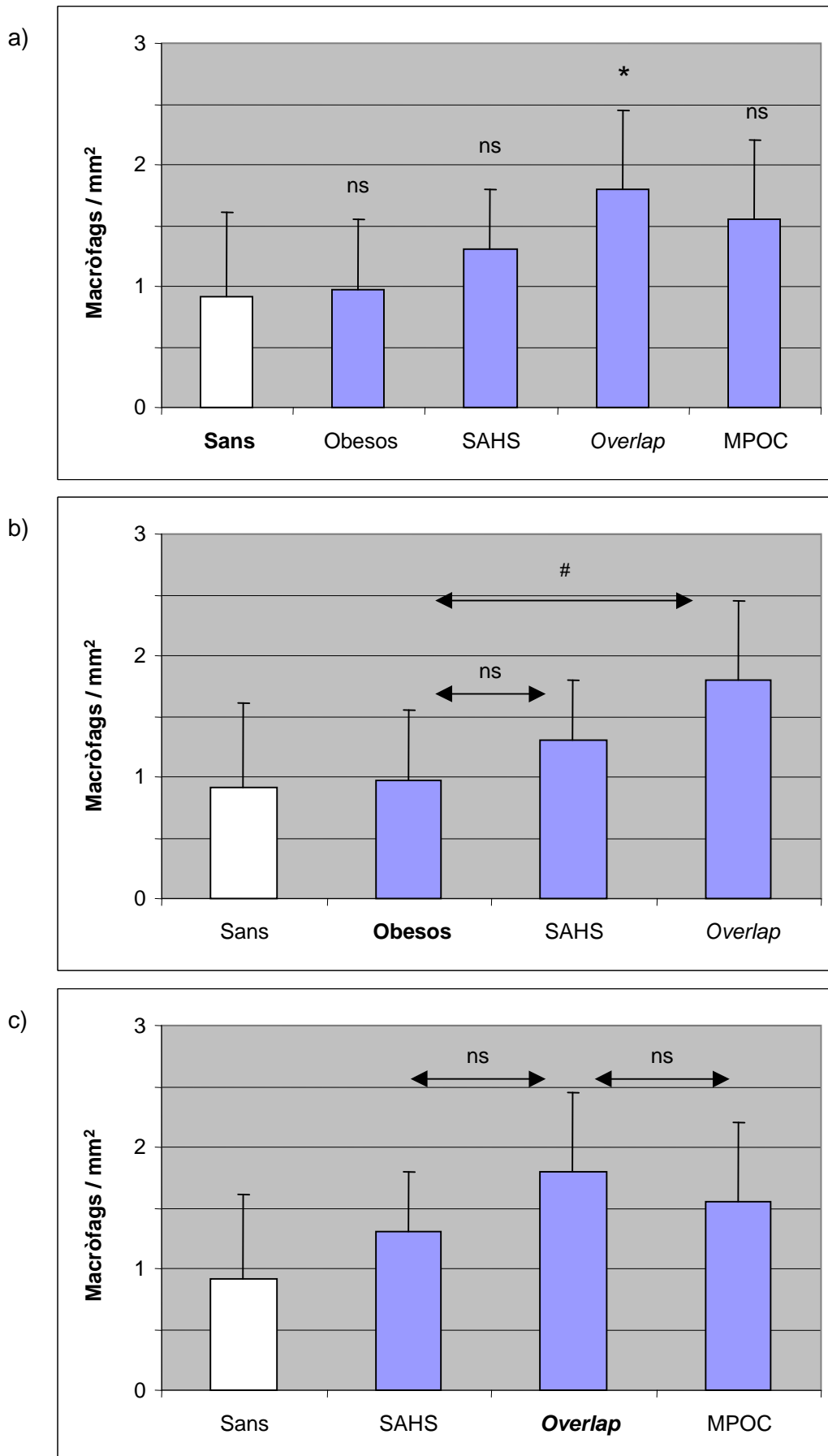
c) Malalts amb OS.

Els pacients amb OS tenen més macròfags ($1,80 \pm 0,65$ cèl.lules/ mm^2 , $p=0,05$) que els controls sans.

d) Subjectes OBESOS.

No s'observen diferències en el número de macròfags entre individus amb obesitat i sans.

Figura XI.11.



II. Efecte malaltia controlat per l'obesitat.a) Pacients amb SAHS.

Tampoc trobem diferències significatives entre els malalts amb SAHS i els obesos.

b) Malalts amb OS.

Els pacients amb OS tenen un major nombre de macròfags en els M. intercostals externs que els subjectes obesos ($0,97 \pm 0,58$ cèl.lules/mm², $p=0,02$).

III. *Overlap Syndrome* i els seus components.a) Pacients amb SAHS.

S'observa una forta tendència a tenir més macròfags per unitat de superfície muscular en els malalts amb OS si els comparem amb els pacients amb SAHS ($1,30 \pm 0,49$ cèl.lules/mm², $p=0,07$).

b) Malalts amb MPOC.

No s'observen diferències significatives entre el grup amb MPOC i el OS.

XI.3.3. Expressió gènica de citocines i receptors de citocines.

Els nivells d'expressió de mRNA per a les diferents citocines han estat estudiats en els cinc grups de malalts que es detallen en l'apartat de metodologia. En els pacients amb MPOC ja s'havien avaluat en altres treballs i van ser publicats pel nostre equip d'investigació (Casadevall 2007).

XI.3.3.1. Interleucina - 1 (IL-1).

A la figura XI.12 queda reflectida l'expressió de IL-1 en el M. intercostal extern dels cinc grups de subjectes estudiats.

I. Efecte malaltia.

a) Pacients amb SAHS.

Els malalts amb SAHS presenten una marcada tendència a una menor expressió de IL-1 que els controls sans ($0,034 \pm 0,024$ vs $0,067 \pm 0,046$ u.a., $p=0,07$).

b) Malalts amb OS.

La mateixa tendència s'observa, en menor grau, en els pacients amb OS ($0,032 \pm 0,018$ u.a., $p=0,13$), que presenten uns nivells d'expressió molt similars.

c) Subjectes OBESOS.

No hi ha diferències significatives en l'expressió gènica de IL-1 al M. intercostal extern entre els individus obesos i els subjectes sans.

d) Pacients amb MPOC.

No s'observen diferències amb els sans.

II. Efecte malaltia controlat per l'obesitat.

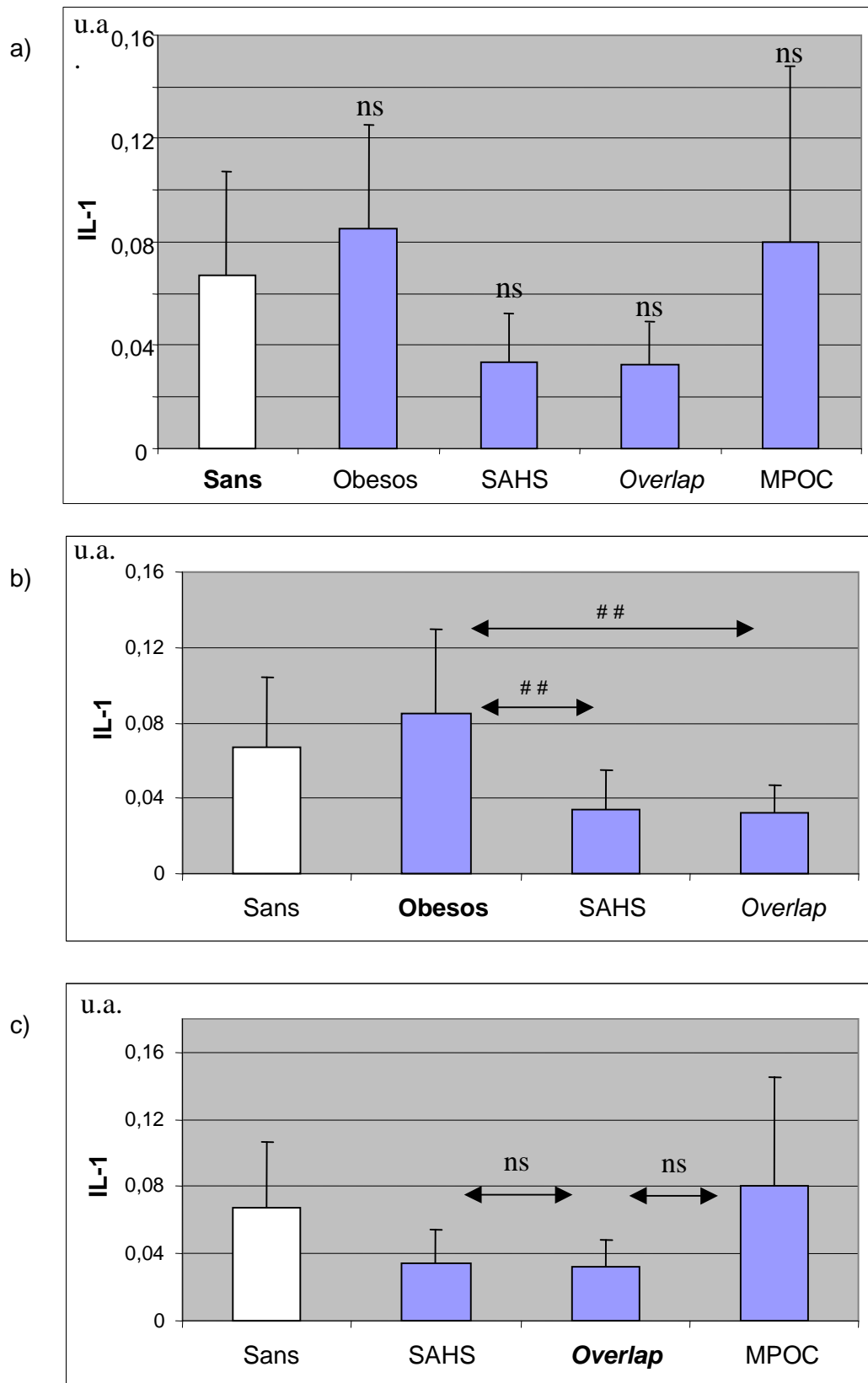
a) Pacients amb SAHS.

Els malalts amb SAHS presenten una menor expressió de IL-1 que els subjectes obesos ($0,085 \pm 0,044$ u.a., $p=0,008$).

b) Malalts amb OS.

En els M. intercostals externs dels pacients amb OS també hem trobat una menor expressió de IL-1 que en els controls obesos ($p=0,004$).

Figura XI.12.



III. *Overlap Syndrome* i els seus components.

a) Pacients amb SAHS.

No hi ha diferències significatives en l'expressió gènica de IL-1 al M. intercostal extern entre els grups de pacients amb SAHS i OS.

b) Malalts amb MPOC.

Els pacients amb MPOC presenten una tendència ($0,083 \pm 0,065$ u.a., $p=0,09$) a una major expressió de IL-1 que els malalts amb OS.

XI.3.3.2. Interleucina – 6 (IL-6).

La figura XI.13 mostra l'expressió de IL-6 en el M. intercostal extern dels cinc grups de subjectes estudiats.

I. Efecte malaltia.

a) Pacients amb SAHS.

No hi ha diferències significatives en l'expressió gènica de IL-6 al M. intercostal extern entre els pacients amb SAHS i els subjectes sans.

b) Malalts amb OS.

No hem trobat diferències significatives respecte als controls sans.

c) Subjectes OBESOS.

Els individus amb obesitat presenten una major expressió de IL-6 que els subjectes sans ($1,34 \pm 0,67$ vs $0,51 \pm 0,48$ u.a., $p=0,03$).

d) Pacients amb MPOC.

No s'observen diferències en l'expressió de IL-6 entre els malalts amb MPOC ($0,50 \pm 0,37$ u.a.) i els controls sans.

II. Efecte malaltia controlat per l'obesitat.a) Pacients amb SAHS.

Els malalts amb SAHS presenten una menor expressió de IL-6 en el M. intercostal extern ($0,76 \pm 0,42$ u.a., $p=0,05$) que els individus obesos.

b) Malalts amb OS.

També en els intercostals dels pacients amb OS hem trobat una menor expressió de IL-6 ($0,49 \pm 0,38$ u.a., $p=0,006$) que en els subjectes obesos.

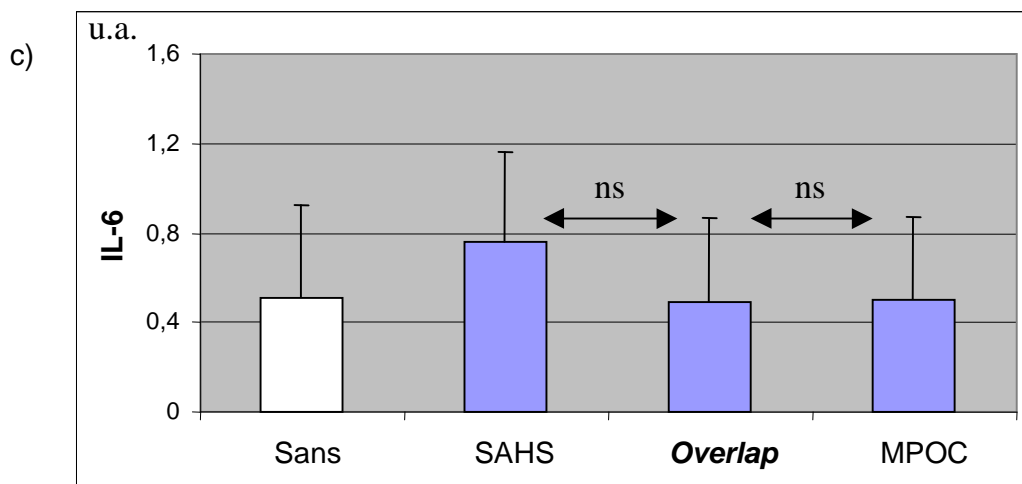
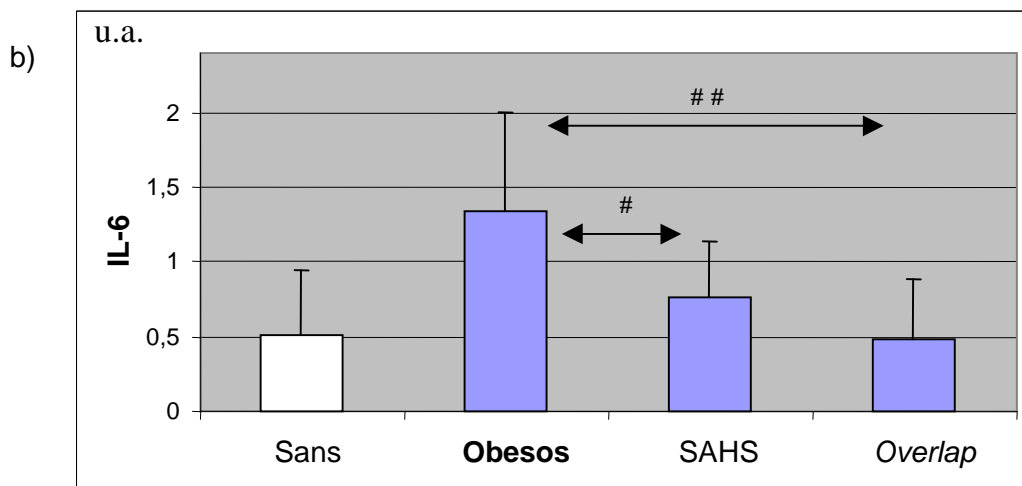
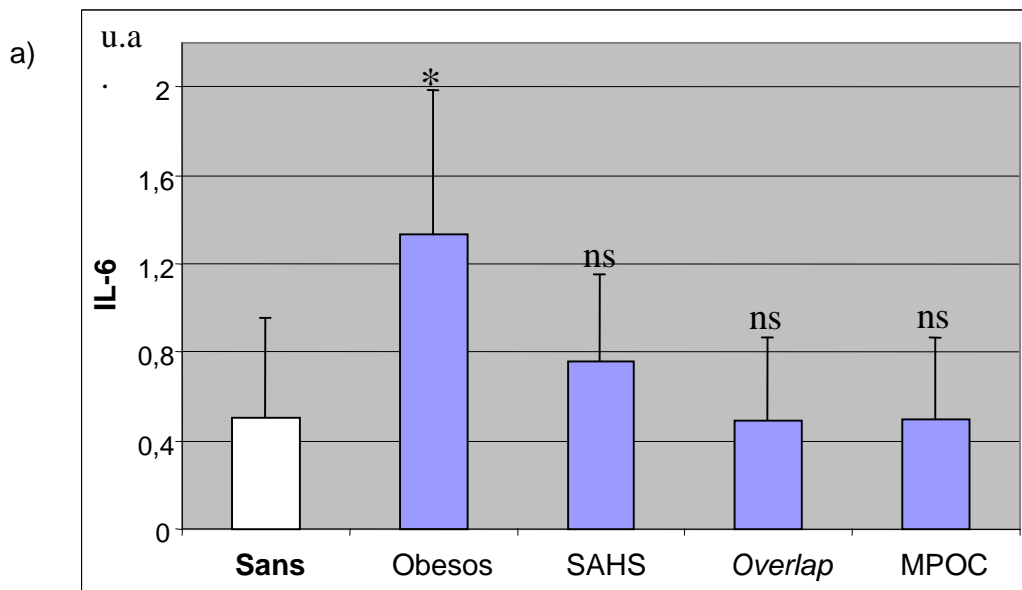
III. *Overlap Syndrome* i els seus components.a) Pacients amb SAHS.

Malgrat no hi hagi diferències significatives, s'aprecia una lleugera tendència a una major expressió de IL-6 en els malalts amb SAHS respecte als pacients amb OS ($p=0,15$).

b) Malalts amb MPOC.

No hi ha diferències entre els pacients amb MPOC i els OS.

Figura XI.13.



XI.3.3.3. Factor de necrosi tumoral *alfa* (TNF).

A la figura XI.14 es mostra l'expressió de TNF en el M. intercostal extern dels cinc grups d'individus estudiats.

I. Efecte malaltia.

a) Pacients amb SAHS.

Els M. intercostals externs dels malalts amb SAHS presenten una forta tendència a una major expressió de TNF que els individus sans ($0,46 \pm 0,21$ vs $0,28 \pm 0,10$ u.a., $p=0,07$).

b) Malalts amb OS.

No hi ha diferències significatives respecte als subjectes sans.

c) Subjectes OBESOS.

Els individus amb obesitat mostren una expressió de TNF superior ($1,16 \pm 0,25$ u.a., $p<0,001$) als subjectes sans.

d) Pacients amb MPOC.

En aquest grup de pacients també s'observa una major expressió de TNF ($0,71 \pm 0,37$ u.a., $p=0,03$) que en els controls sans.

II. Efecte malaltia controlat per l'obesitat.

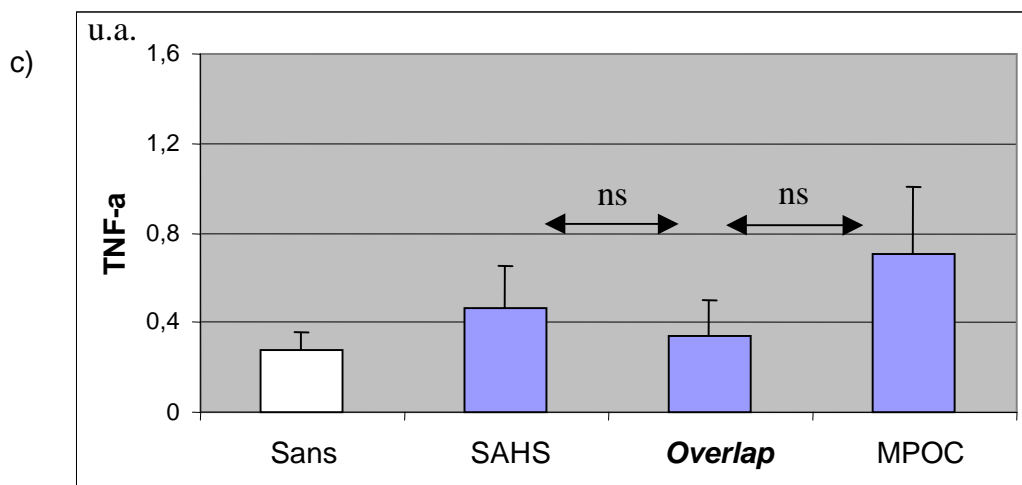
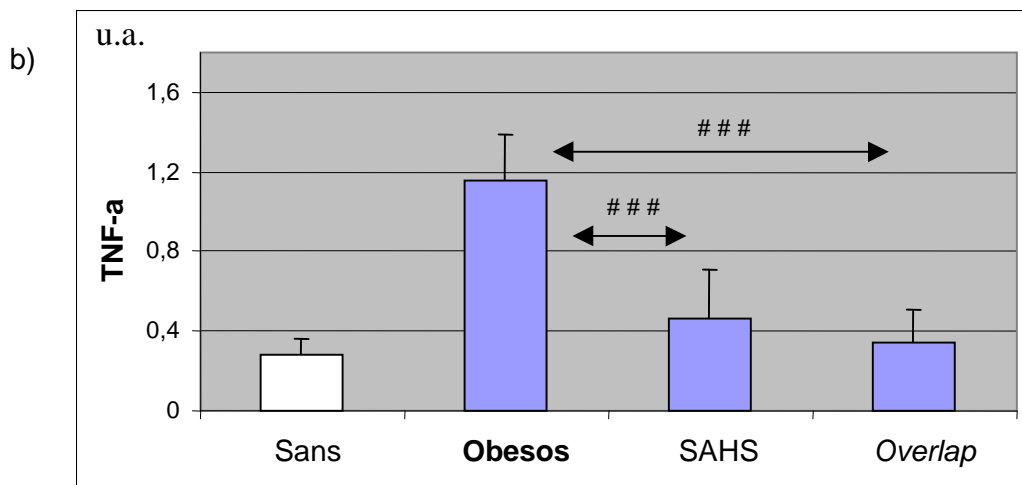
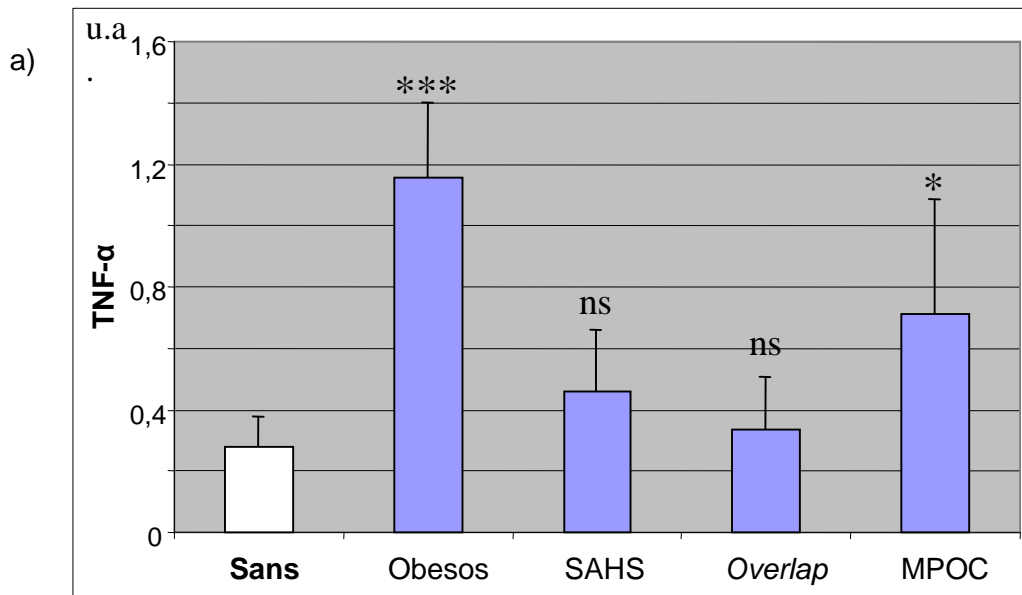
a) Pacients amb SAHS.

Els malalts amb SAHS presenten una menor expressió de TNF als seus M. intercostals externs que els subjectes obesos ($p<0,001$).

b) Malalts amb OS.

Els pacients amb OS també presenten una menor expressió de TNF ($0,34 \pm 0,16$ u.a., $p<0,001$) que els individus obesos.

Figura XI.14.



III. *Overlap Syndrome* i els seus components.

a) Pacients amb SAHS.

En els malalts amb SAHS no s'observen diferències significatives quant a l'expressió de TNF respecte als pacients amb OS.

b) Malalts amb MPOC.

No hi ha diferències amb els pacients amb OS.

XI.3.3.4. Receptor 1 del TNF (TNFr1).

Per problemes tècnics i de processament de la mostra, els nivells d'expressió de mRNA pels receptors de TNF no van poder ser determinats amb garanties en els subjectes sans. Malgrat les limitacions que suposa no disposar d'aquest grup control, a continuació exposem els resultats obtinguts en els quatre grups estudiats.

Les figures XI.15a i XI.15b mostren l'expressió de TNFr1 en el M. intercostal extern dels grups de subjectes estudiats.

I. Efecte malaltia controlat per l'obesitat.

a) Pacients amb SAHS.

No s'observen diferències en l'expressió de TNFr1 entre els individus amb obesitat i els malalts amb SAHS.

b) Malalts amb OS.

Hi ha una major expressió de TNFr1 en els subjectes obesos que en els malalts amb OS ($4,06 \pm 2,33$ vs $1,39 \pm 1,19$ u.a., $p=0,04$).

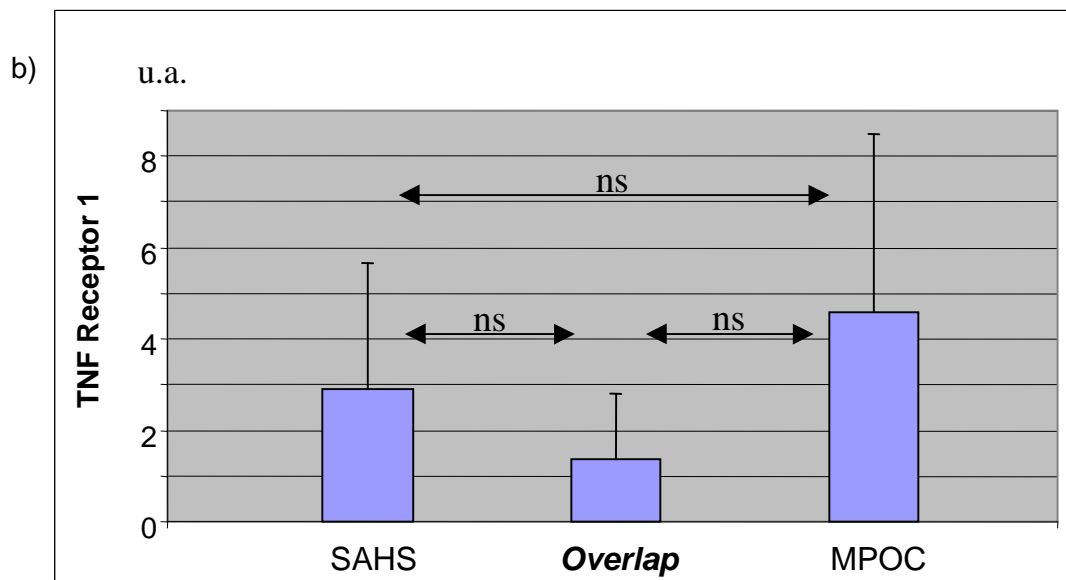
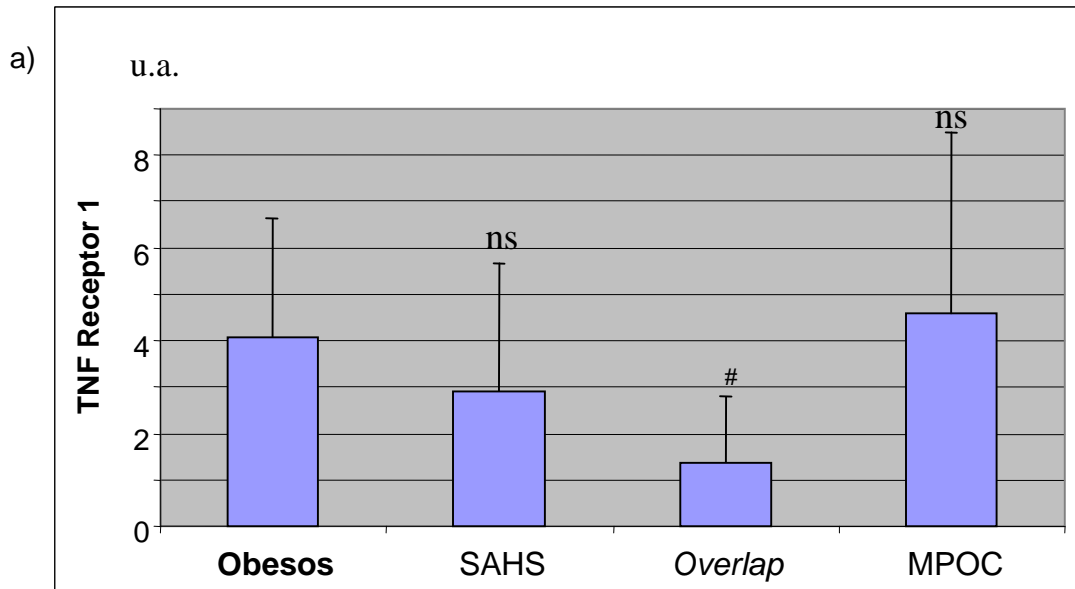
II. *Overlap Syndrome* i els seus components.a) Pacients amb SAHS.

S'observa una certa tendència a una major expressió de TNFr1 en els pacients amb SAHS ($2,91 \pm 2,40$ u.a., $p=0,09$) respecte als malalts amb OS.

b) Malalts amb MPOC.

Tanmateix els M. intercostals dels pacients amb MPOC presenten una major tendència a expressar TNFr1 ($4,58 \pm 3,98$ u.a., $p=0,11$) que els pacients amb OS.

Figura XI.15.



XI.3.3.5. Receptor 2 del TNF (TNFr2).

Les figures XI.16a i XI.16b mostren l'expressió de TNFr2 en el M. intercostal extern dels individus estudiats.

I. Efecte malaltia controlat per l'obesitat.a) Pacients amb SAHS.

No s'observen diferències en l'expressió de TNFr2 entre els subjectes obesos i els pacients amb SAHS.

b) Malalts amb OS.

Hi ha una discreta tendència a una major expressió de TNFr2 en els individus obesos respecte als malalts amb OS ($2,74 \pm 0,41$ vs $2,17 \pm 1,13$ u.a., $p=0,19$).

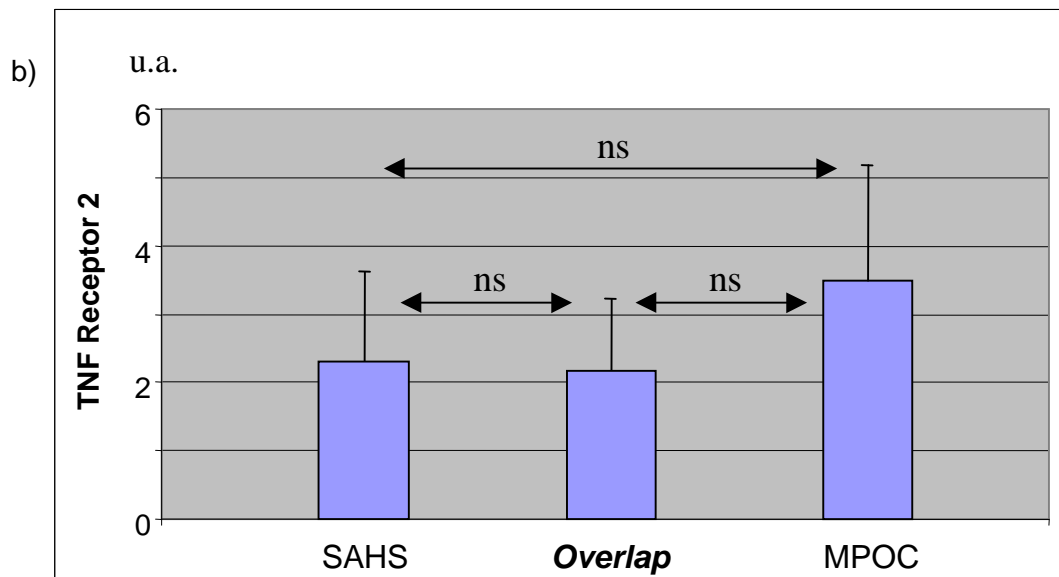
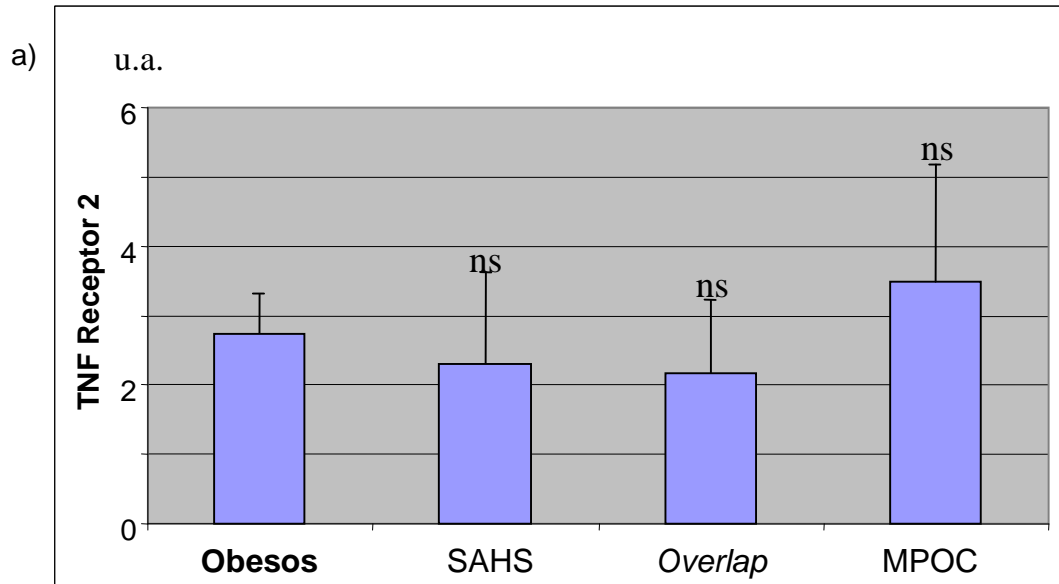
II. *Overlap Syndrome* i els seus components.a) Pacients amb SAHS.

No trobem diferències significatives entre SAHS ($2,30 \pm 1,36$ u.a.) i OS.

b) Malalts amb MPOC.

En els M. intercostals dels pacients amb MPOC s'observa una tendència a una major expressió de TNFr2 ($3,48 \pm 1,77$ u.a., $p=0,09$) respecte als malalts amb OS.

Figura XI.16.



XI.3.3.6. Interleucina – 10 (IL-10).

A la figura XI.17 podem veure l'expressió de IL-10 en el M. intercostal extern dels grups d'individus estudiats.

I. Efecte malaltia.

a) Pacients amb SAHS.

Presenten una menor expressió de IL-10 que els controls sans ($0,33 \pm 0,13$ vs $0,71 \pm 0,34$ u.a., $p=0,04$).

b) Malalts amb OS.

Els malalts amb OS també presenten una menor expressió de IL-10 que els controls sans ($0,35 \pm 0,16$ u.a., $p=0,05$).

c) Subjectes OBESOS.

No hi ha diferències significatives en l'expressió gènica de IL-10 entre individus obesos i sans, tot i que existeix una gran dispersió de valors.

d) Pacients amb MPOC.

En els M. intercostals dels pacients amb MPOC s'observa una tendència ($0,42 \pm 0,27$ u.a., $p=0,14$) a una menor expressió de IL-10 que en els subjectes sans.

II. Efecte malaltia controlat per l'obesitat.

a) Pacients amb SAHS.

Els pacients amb SAHS presenten una tendència a una menor expressió de IL-10 que els individus obesos ($1,00 \pm 0,92$ u.a., $p=0,14$), que com ja s'ha comentat presenten valors molt dispersos.

b) Malalts amb OS.

En els M. intercostals externs dels pacients amb OS també hem trobat una tendència a una menor expressió de IL-10 que en els obesos ($p=0,15$).

III. *Overlap Syndrome* i els seus components.

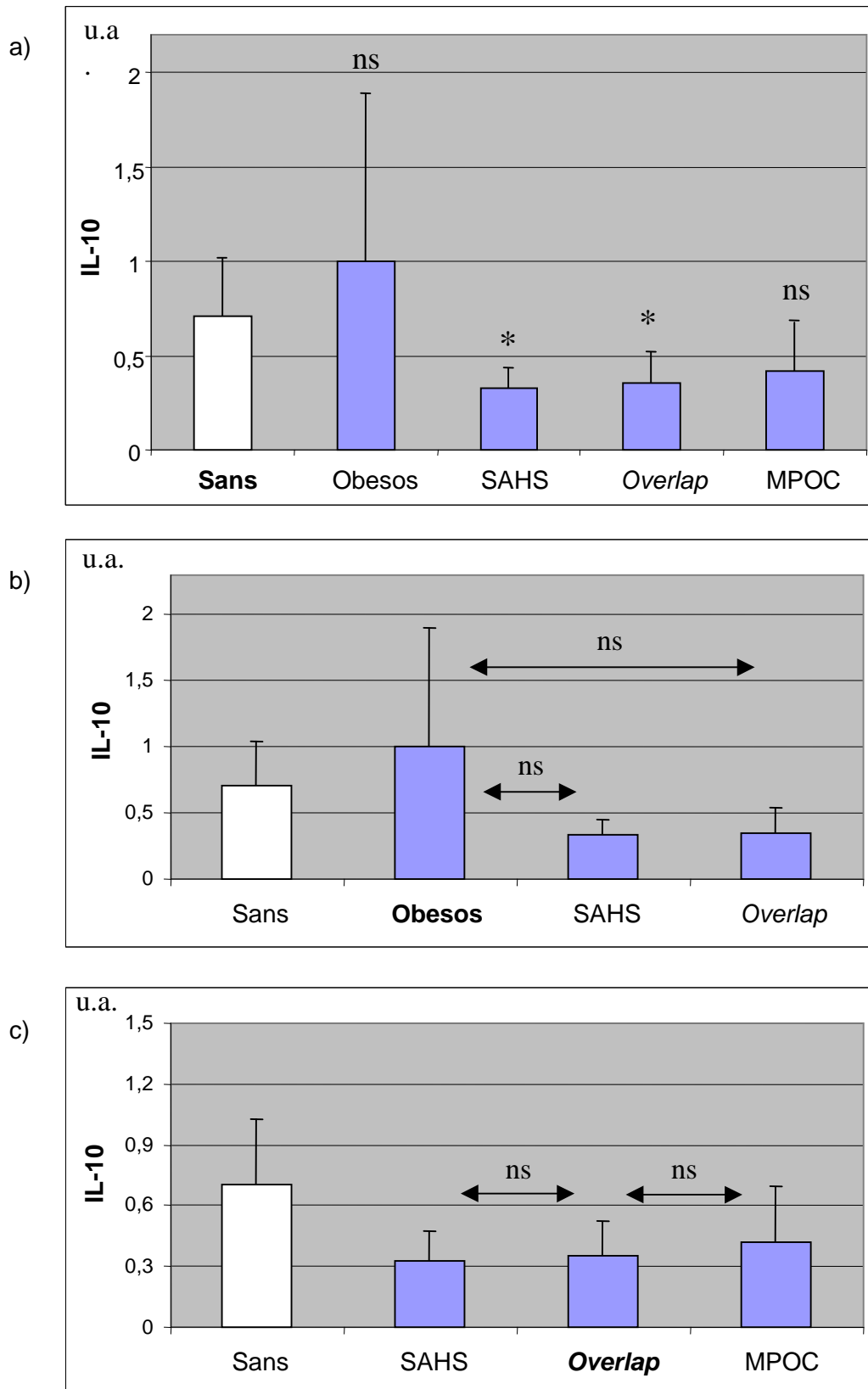
a) Pacients amb SAHS.

No s'han trobat diferències significatives entre els pacients amb SAHS i OS.

b) Malalts amb MPOC.

No s'observen diferències amb els malalts amb OS.

Figura XI.17.



XI.4. RESUM DE RESULTATS. PART 1. ESTUDI DESCRIPTIU I COMPARATIU.**Morfometria.****Percentatges fibril.lars.**

Els M. intercostals externs dels malalts amb MPOC i OS tenen un tant per cent de fibres tipus I superior als individus sans. Els pacients amb OS també presenten un increment del percentatge de fibres tipus I respecte als subjectes obesos sense comorbiditat.

No hi ha diferències quant als percentatges fibril.lars entre els individus obesos i els subjectes del grup control.

Els malalts amb SAHS mostren la mateixa tendència que els pacients amb OS respecte als subjectes amb obesitat, però en aquest cas no s'arriba a la significació estadística. Comparant els dos darrers grups de pacients, en els malalts amb OS s'observa una tendència a un major percentatge de fibres tipus I que en els pacients amb SAHS.

D'altra banda, hi ha un predomini de fibres musculars aeròbiques en front de les anaeròbiques en els subjectes que pateixen alguna de les tres principals malalties estudiades, MPOC, SAHS i OS. Per contra, els individus que pertanyen al grup control i el grup d'obesos presenten una tendència al predomini de fibres anaeròbiques en el seu intercostal extern.

Tamany de les fibres.

Malgrat que els grups amb un BMI superior semblen presentar xifres més altes en el tamany global de les fibres, en cap cas s'arriba a la significació estadística.

Respecte als tamanyos atenent als tipus fibril.lars, els M. intercostals externs dels malalts amb SAHS presenten una àrea de les tipus I superior als controls sans. S'observa una tendència similar en els pacients amb OS i en els subjectes obesos.

No hem trobat diferències significatives en l'àrea de les fibres tipus II en els grups estudiats, encara que els malalts amb SAHS tenen una tendència a presentar aquestes fibres de major tamany que els controls sans. Tanmateix, el major tamany de les fibres dels individus obesos no mostra diferències significatives, probablement per la gran dispersió que mostren la seves àrees musculars.

Espai ocupat per les fibres.

La superfície ocupada per les fibres de tipus I, de metabolisme aeròbic, és clarament superior en tots els grups de malalts estudiats (MPOC, SAHS, OS) respecte als controls sans. També en els subjectes obesos trobem una tendència de les fibres tipus I a ocupar un major espai muscular, si els comparem amb els controls sans.

D'altra banda, la superfície ocupada per les cèl.lules de tipus II, de metabolisme anaeròbic, no sembla relacionada ni amb la presència d'obesitat ni amb la SAHS. Per contra, en els individus amb MPOC i, també en els OS, observem un espai ocupat per les fibres tipus II que sembla ser inferior als controls. Això no obstant, només quan comparem els malalts amb OS amb els subjectes obesos les diferències arriben a la significació estadística.

Expressió gènica de les cadenes pesants de miosina.

Els controls sans i els pacients amb OS mostren els valors més baixos d'expressió de MyHC I en els seus M. intercostals. En ser comparats amb els altres grups només s'observen tendències en aquesta direcció. L'única diferència que assoleix significació estadística la trobem entre els malalts amb OS i els individus obesos.

Per la seva banda, els pacients amb OS presenten una menor expressió gènica de MyHC IIa que els malalts amb SAHS. La mateixa tendència s'observa, amb nivells propers a la significació estadística, al comparar els malalts amb OS amb els individus sans, els obesos i els pacients amb MPOC. Cal destacar que és en els tres grups que tenen en comú la presència d'una obesitat important, on observem una menor expressió de MyHC IIa (tendències).

Els individus sans són els que presenten una major expressió gènica de MyHC IIX en els seus M. intercostals externs. Per contra, en tota la resta de grups, observem una menor expressió de MyHC IIX. Cal remarcar que el grup que presenta una menor expressió de MyHC IIX és el dels pacients amb OS, sent els seus nivells d'expressió de MyHC IIX clarament inferiors als dels obesos i els malalts amb SAHS..

INFLAMACIÓ.

Identificació de cèl.lules inflamatòries.

És de destacar que en tots els grups estudiats hi ha cèl.lules inflamatòries, fins i tot en els individus sans. La presència de cèl.lules inflamatòries no es correspon amb un infiltrat cel.lular inflamatori, ni per la seva quantitat ni per la seva distribució.

Presència de leucòcits (cèl.lules CD45+).

En totes les malalties estudiades (SAHS, OS i MPOC) hi ha una presència augmentada de leucòcits en el M. intercostal extern respecte al grup control i als individus obesos. Aquests últims també semblen tenir més leucòcits que els sans, malgrat les diferències no arribin a la significació estadística.

Al comparar els diferents grups de malalts s'observa un major número de leucòcits en el grup amb OS respecte a les altres dues entitats nosològiques que conformen la síndrome de composició (SAHS i MPOC).

Presència de macròfags (cèl.lules CD68+).

En el recompte de macròfags al M. intercostal extern, només trobem diferències significatives entre els malalts amb OS i els controls sans d'una banda, i els subjectes

obesos de l'altra. Els intercostals dels pacients amb OS presenten més macròfags que els dels dos grups esmentats.

La resta de troballes les podríem resumir dient que les diferències en el nombre de macròfags per unitat de superfície muscular entre els grups d'estudi són més petites que en el cas dels leucòcits totals, encara que van en la mateixa direcció. De manera que si quan analitzàvem els leucòcits parlàvem de diferències rellevants, en estudiar els macròfags hem de parlar gairebé sempre de tendències.

Expressió gènica de citocines i receptors de citocines.

Expressió gènica de citocines proinflamatòries.

Els individus obesos presenten una major expressió de IL-6 i TNF que els subjectes sans.

En el M. Intercostal dels subjectes obesos hi ha una major expressió de les tres citocines proinflamatòries estudiades (IL-1, IL-6, TNF) respecte als malalts amb OS i SAHS. En canvi, l'expressió de IL-10, citocina coneguda pel seu paper antiinflamatori, no es troba significativament elevada en els malalts amb obesitat, malgrat observar-se una certa tendència en aquest sentit.

No observem diferències significatives en l'expressió gènica de les diferents citocines entre els malalts amb OS i els pacients amb SAHS. Malgrat tot, hi ha una tendència a una major expressió de IL-6 i TNF en els malalts amb SAHS.

Els pacients amb MPOC presenten una major expressió de TNF que els controls sans en els seus M. intercostals. Com ja s'ha comentat, l'expressió de IL-10 en aquests malalts respiratoris presenta una tendència a ser menor que en els individus sans.

No es troben diferències significatives en l'expressió de les citocines estudiades entre els malalts amb MPOC i els pacients amb OS, si bé es cert que hi ha una tendència a la major expressió de IL-1 en els malalts amb MPOC.

Expressió de Receptors de TNF.

Hi ha una major expressió de TNFr1 en els subjectes obesos que en els malalts amb OS. Els malalts amb SAHS i MPOC també mostren una tendència a presentar una expressió de TNFr1 superior als pacients amb OS.

També trobem una tendència a una major expressió de TNFr2 en els individus obesos respecte als malalts amb OS. Igualment s'observa una tendència a una major expressió de TNFr2 en els pacients amb MPOC respecte als malalts amb OS.

Expressió gènica de la citocina antiinflamatòria.

Els M. intercostals dels individus sans mostren una expressió gènica de IL-10 superior als malalts amb SAHS i OS. S'observa una tendència similar en els pacients amb MPOC. En canvi, no es troben diferències amb l'altre grup de subjectes sense cap altra malaltia subjacent: els obesos.

Globalment considerat, el TNF és la citocina que mostra unes diferències més marcades entre grups, seguida de la IL-6 i la IL-10. Trobem menys diferències en l'expressió de IL-1.

XI.5. ADDENDUM DE RESULTATS. PART 1.

Per acabar l'exposició dels resultats s'inclou a continuació l'estudi de paràmetres lligats a l'estrès oxidatiu (expressió gènica d'hemoxygenasa), els diferents isoenzims de les sintetases de l'òxid nítric i l'expressió gènica de leptina, éssent aquest darrer un gen lligat al metabolisme amb evidents connexions amb els sobrepès i l'obesitat.

Els hem afegit al final de la descripció dels resultats perquè poden ser interessants per a completar la comprensió dels fenòmens que es produeixen a nivell subcel.lular en el M. intercostal extern, encara que inicialment varen ser estudiats pel nostre grup com un ampli sondeig de gens per a futures investigacions.

XI.5.1. Estrès oxidatiu i Òxid Nítric.

Els nivells d'expressió de mRNA per a la hemoxygenasa - 1 i les diferents sintetases de l'òxid nítric (NO) no varen ser estudiats ni en els malalts amb MPOC ni en els subjectes sans, per les raons abans esmentades. Es remet al lector interessat a una publicació del nostre grup (Barreiro 2007).

XI.5.1.1. Hemoxygenasa - 1 (HO-1).

La figura XI.18 mostra l'expressió de HO-1 en el M. intercostal extern dels individus estudiats.

I. Efecte malaltia controlat per l'obesitat.

a) Pacients amb SAHS.

L'expressió de HO-1 en el M. intercostal extern dels subjectes obesos és superior a la dels pacients amb SAHS ($5,64 \pm 5,73$ vs $1,41 \pm 1,65$ u.a., $p=0,02$).

b) Malalts amb OS.

L'expressió de HO-1 en el M. intercostal extern dels individus obesos també és superior a la dels pacients amb OS ($0,43 \pm 0,22$ u.a., $p<0,001$).

II. *Overlap Syndrome* i els seus components.

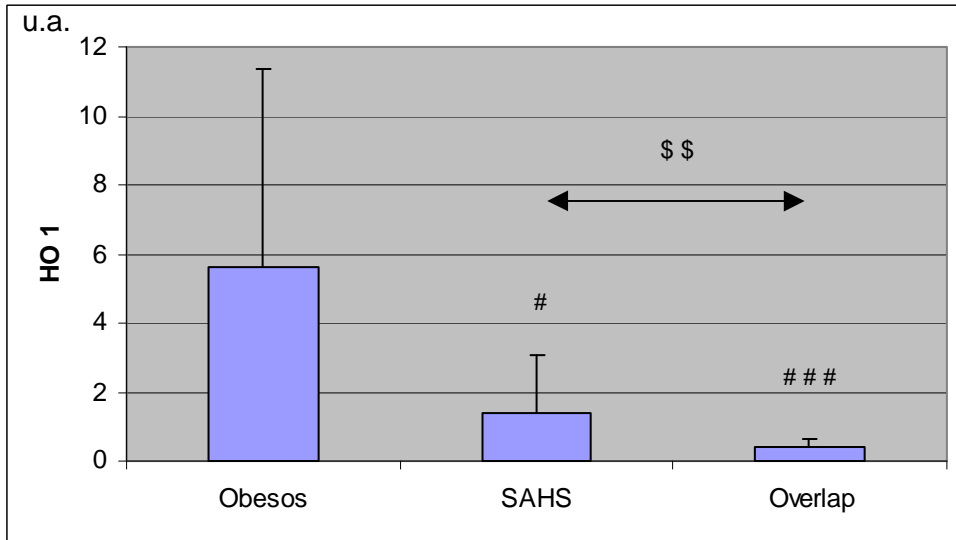
a) Pacients amb SAHS.

L'expressió de HO-1 en els músculs respiratoris estudiats és més gran en els pacients amb SAHS que en els OS ($p=0,01$).

b) Malalts amb MPOC.

Com ja s'ha mencionat, no van ser estudiats en aquest protocol.

Figura XI.18.



XI.5.1.2. Òxid nítric sintetasa induïble (iNOS).

A les figures XI.19a, XI.19b i XI.19c es mostra l'expressió dels tres tipus d'òxid nítric sintetasa en el M. intercostal extern dels tres grups d'individus estudiats.

I. Efecte malaltia controlat per l'obesitat.

a) Pacients amb SAHS.

L'expressió de iNOS en el M. intercostal extern dels subjectes obesos és superior a la dels pacients amb SAHS ($0,049 \pm 0,028$ vs $0,022 \pm 0,01$ u.a., $p=0,04$).

b) Malalts amb OS.

Els M. intercostals externs dels individus amb obesitat també presenten una expressió de iNOS superior a la dels malalts amb OS ($0,018 \pm 0,014$ u.a., $p=0,03$).

II. *Overlap Syndrome* i els seus components.

a) Pacients amb SAHS.

No observem diferències significatives entre pacients amb SAHS i OS.

b) Malalts amb MPOC.

No van ser estudiats.

XI.5.1.3. Òxid nítric sintetasa endotelial (eNOS).

I. Efecte malaltia controlat per l'obesitat.

a) Pacients amb SAHS.

Observem una lleugera tendència a que els individus obesos presentin una major expressió de eNOS en el seu M. intercostal extern que els pacients amb SAHS ($4,95 \pm 2,82$ vs $2,97 \pm 1,29$ u.a., $p=0,12$).

b) Malalts amb OS.

Els M. intercostals externs dels controls obesos presenten una expressió de eNOS superior a la dels malalts amb OS ($1,67 \pm 0,69$ u.a., $p=0,02$).

II. *Overlap Syndrome* i els seus components.a) Pacients amb SAHS.

Els pacients amb SAHS mostren una major expressió de eNOS als seus M. intercostals externs que els malalts amb OS ($p=0,01$).

b) Malalts amb MPOC.

No van ser estudiats.

XI.5.1.4. Òxid nítric sintetasa neuronal (nNOS).**I. Efecte malaltia controlat per l'obesitat.**a) Pacients amb SAHS.

No s'observen diferències significatives entre els SAHS i els subjectes amb obesitat.

b) Malalts amb OS.

Els individus obesos presenten una major expressió de nNOS que els malalts amb OS ($3,45 \pm 2,45$ vs $0,99 \pm 0,67$ u.a., $p=0,04$).

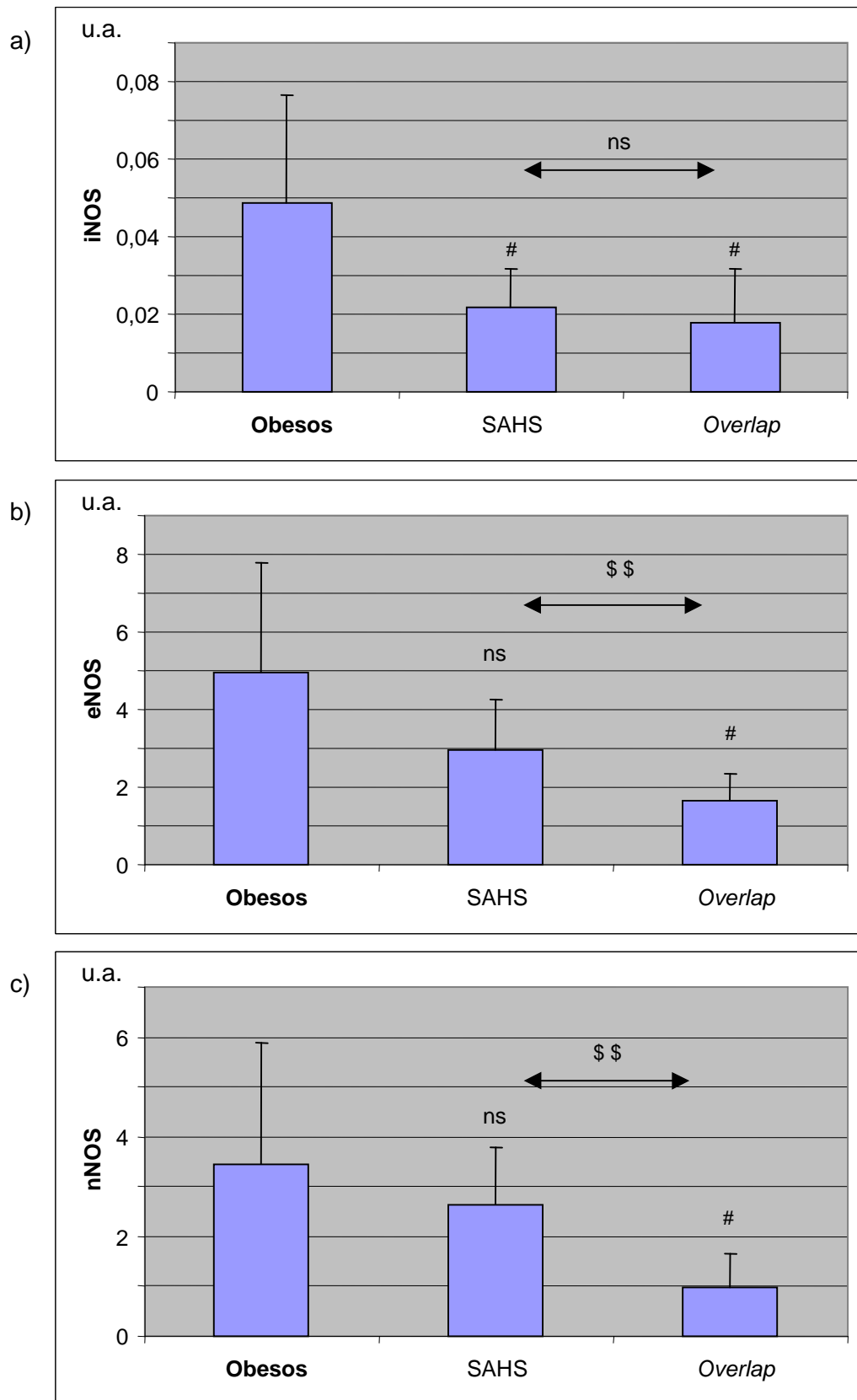
II. *Overlap Syndrome* i els seus components.a) Pacients amb SAHS.

Els pacients amb SAHS mostren una major expressió de nNOS als seus M. intercostals ($2,62 \pm 1,15$ u.a., $p=0,002$) que els malalts amb OS.

b) Malalts amb MPOC.

No van ser estudiats.

Figura XI.19.



XI.5.2. Gens lligats al metabolisme (leptina).

L'expressió de leptina en el M. intercostal extern es pot veure reflectida a la figura XI.20.

I. Efecte malaltia controlat per l'obesitat.

a) Pacients amb SAHS.

Hi ha una discreta tendència a una major expressió de leptina en els intercostals dels individus obesos (amb una gran dispersió de valors) respecte als pacients amb SAHS ($3,39 \pm 5,30$ vs $0,90 \pm 0,74$ u.a., $p=0,10$).

b) Malalts amb OS.

Els pacients amb OS també mostren una gran dispersió dels seus valors i no mostren diferències significatives amb els individus obesos.

II. *Overlap Syndrome* i els seus components.

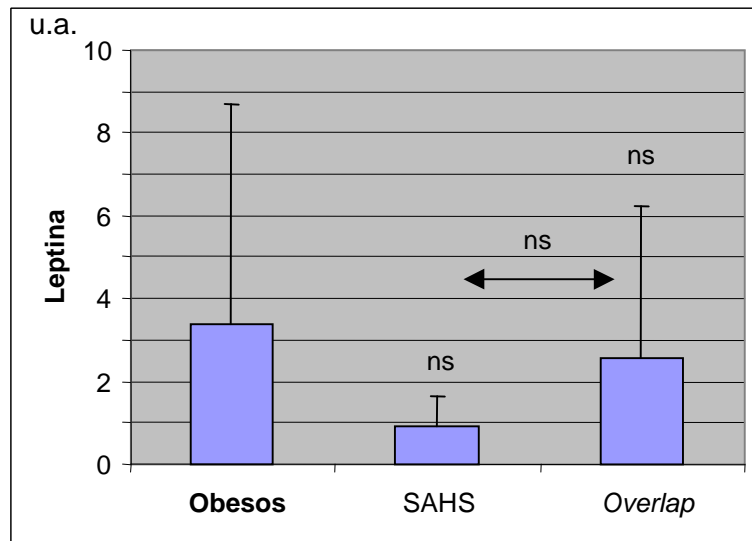
a) Pacients amb SAHS.

Els M. intercostals externs dels pacients amb SAHS mostren una lleugera tendència a expressar menys leptina que els malalts amb OS ($2,56 \pm 3,66$ u.a., $p=0,16$).

b) Malalts amb MPOC.

No van ser estudiats.

Figura XI.20.



XI.5.3. Resum de l'Addendum de Resultats. Part 1.**Estrès oxidatiu i Òxid Nítric.****Hemoxigenasa – 1 (HO-1).**

L'expressió de HO-1 en el M. intercostal extern dels controls obesos és superior a la dels pacients amb SAHS i OS.

D'altra banda, els malalts amb OS presenten una menor expressió de HO-1 que els pacients amb SAHS.

Expressió de les òxid nítric sintetases (NOS).

L'expressió de les tres isoformes d'aquest enzim o bé té tendència o és significativament superior en els individus amb obesitat que en els malalts amb SAHS o amb OS.

L'expressió de iNOS és superior en els subjectes obesos que en els malalts amb SAHS i OS. No observem diferències significatives entre els pacients que pateixen aquestes dues malalties.

En els pacients amb SAHS i en els individus obesos s'observa una major expressió de eNOS que en els malalts amb OS.

Els malalts amb SAHS i els subjectes obesos presenten una major expressió gènica de nNOS que els pacients amb OS.

Gens lligats al metabolisme (leptina).

Els pacients amb SAHS mostren una lleugera tendència a expressar menys leptina que els individus obesos i els malalts amb OS. Les diferències no assoleixen, en cap cas, la significació estadística.

XII. RESULTATS. PART 2.**XII.1. EFECTES DEL TRACTAMENT AMB CPAP.**

En aquest segon apartat dels resultats de la tesi exposarem els canvis produïts pel tractament amb CPAP en els dos grups de pacients als quals s'els hi va aplicar l'esmentat tractament: els malalts amb SAHS i els pacients amb OS.

Tanmateix, l'anàlisi de les variables abans i després d'aplicar el tractament, es dividirà en diferents apartats, de forma molt semblant a com s'ha fet en la part precedent:

- Estudi de la funció respiratòria
- Estudi de la funció muscular i de la tolerància a l'exercici
- Estudi del son
- Morfometria muscular
- Expressió gènica de les cadenes pesants de miosina
- Expressió gènica de citocines i dels seus receptors

L'efecte del tractament amb CPAP sobre les cèl.lules inflamatòries a nivell muscular no ha estat avaluat en el present treball, i només disposem de dades basals.

NOTA: entre parèntesi s'exposaran els valors pre- i post-CPAP respectivament, seguits del valor de "p" quan aquesta sigui significativa.

XII.1.1. Estudi de la funció respiratòria diürna.

A la taula XII.1 es poden veure els principals valors de les proves funcionals respiratòries abans i després d'aplicar el tractament amb CPAP.

Grup SAHS.

Només hem objectivat canvis significatius en els valors del FEV₁% (95,6 ± 9 vs 100 ± 8 %, p=0,01) i de la TLC% (103,3 ± 7 vs 108,5 ± 7 %, p=0,03), tot i mantenint-se sempre dintre dels valors de referència..

Les tendències a la milloria en la PaO₂ i la PaCO₂ són discretes, i no assoleixen significació estadística.

Grup OS.

L'únic paràmetre de la funció respiratòria que ha millorat significativament ha estat la FVC% (85 ± 12 vs 93 ± 11 %, p=0,01), també sempre dintre dels marges de referència.

Ha mostrat una forta tendència a la milloria la Raw_{TOT}% (169 ± 92 vs 126 ± 38 %, p=0,07).

La PaO₂, la PaCO₂, i el FEV₁% no han milloran lo suficient com per a assolir la significació estadística.

XII.1.2. Estudi de la funció muscular i de la tolerància a l'exercici.

A la taula XII.2 es mostren els paràmetres avaluats tant de la funció muscular perifèrica com respiratòria en els 2 grups de pacients que van ser estudiats.

Grup SAHS.

La PEM després del tractament amb CPAP mostra una tendència a ser més gran (164 ± 47 vs 200 ± 28 cmH₂O., p=0,08).

Daltra banda, la PIM i la força muscular perifèrica no milloren prou com per aconseguir una rellevància estadística.

No s'ha trobat cap milloria en la prova dels sis minuts de la marxa (6mwd).

Grup OS.

El tractament amb CPAP augmenta la PIM (85 ± 31 vs 102 ± 31 cmH₂O., $p=0,04$) i la força a la mà esquerra (Lhand, no dominant) (35 ± 10 vs 46 ± 11 cmH₂O., $p=0,009$).

Tanmateix, existeix una clara tendència a l'augment de la força pel que fa a la PEM (164 ± 45 vs 184 ± 42 cmH₂O., $p=0,06$) i a la força a la mà dreta (Rhand) ($41,5 \pm 12$ vs 48 ± 11 cmH₂O., $p=0,07$).

En els pacients amb OS tampoc s'ha trobat una milloria en la tolerància a l'exercici, avaluada mitjançant el 6mwd.

Taula XII.1.1.:

Comparativa Proves Funcionals Respiratòries pre- i post-CPAP:

	SAHS				Overlap			
	Pre		Post		Pre		Post	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
PaO₂	76,1	8	79,4	10	61,5	7	66,3	9
PaCO₂	41,2	3	40,7	2	45,1	6	42,5	5
FEV₁	95,6	9	100 **	8	63,1	13	66,7	17
FVC	111,4	9	113,1	8	85,3	12	93,2 **	11
FEV₁/FVC	75,8	4	73,5	2	60,7	9	59,2	11
Raw tot	99,8	30	96,6	19	169,4	92	126,3	38
FRC	89,9	17	94,1	17	98,7	17	106	23
RV	97,1	19	102,7	33	126,7	27	118,8	41
TLC	103,3	7	108,5 *	7	97,4	10	98,6	15
RV/TLC	43,4	4	45,7	5	48,1	3	46,6	2
DLco	117,9	21	127,5	21	112,8	11	115,4	13
DLco/VA	92,2	11	96,7	12	89	10	88,3	13

* p = 0,05; ** p = 0,01; *** p = 0,001

* Indica diferències pre- i post-CPAP

Taula XII.2.:

Comparativa Funció muscular i tolerància a l'exercici pre- i post-CPAP:

	SAHS				Overlap				
	Pre		Post		Pre		Post		
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	
BMI	<i>Kg/m²</i>	35,7	4	34,9	4	38,8	5	37,9	7
Mà dreta (DOM)	<i>Kg</i>	51,2	19	60,2	17	41,5	12	48	11
Mà esquerra (ND)	<i>Kg</i>	54,6	15	59	16	35,3	10	46,1 **	11
PIM	<i>cmH₂O</i>	137,1	35	157,2	30	84,6	31	101,8 *	31
PEM	<i>cmH₂O</i>	163,8	47	200,4	28	163,9	46	183,6	42
6MWD	<i>metres</i>	583,9	78	554,7	127	459,8	134	472,8	119

* p = 0,05; ** p = 0,01; *** p = 0,001

* Indica diferències pre- i post-CPAP

M = Mitjana

SD = Desviació estàndar

Pre = PreCPAP

Post = PostCPAP

BMI = Índex de Massa Corporal

DOM = Dominant

ND = No dominant

Mà dreta = Força a la mà dreta

Mà esquerra = Força a la mà esquerra

PIM = Pressió Inspiratòria Màxima

PEM = Pressió Espiratòria Màxima

6MWD = Prova dels 6 minuts de la marxa

XII.1.3. Estudi del son.

La taula XII.3 conté els paràmetres obtinguts durant la polisomnografia nocturna abans de començar el tractament amb CPAP i després d'haber-lo instaurat.

Grup SAHS.

Els pacients van rebre una CPAP mitjana de $9,3 \pm 2$ cmH₂O i el seu seguiment mitjà va ser de 7 ± 2 hores per nit.

Com era d'esperar, han millorat tots els paràmetres avaluats al Laboratori del Son.

Després del tractament amb CPAP, l'índex d'apnees-hipopnees (AHI) ha passat de $76,6 \pm 30$ a 3 ± 4 e/h ($p < 0,001$). La saturació mitjana d'oxigen durant la nit ha augmentat de $84,1 \pm 4$ a $93,1 \pm 2$ % ($p = 0,007$). La saturació mínima d'oxigen durant la nit ha passat de $63,9 \pm 13$ a $87,7 \pm 4$ % ($p = 0,01$). El temps transcorregut per sota d'una saturació d'oxigen del 90% (T90) ha disminuït de $77,3 \pm 13$ a $7,9 \pm 13$ ($p = 0,007$). Finalment, la puntuació a l'Escala de Somnolència d'Epworth (ESS) ha passat de 16 ± 4 a 9 ± 4 ($p = 0,01$).

Grup OS.

Aquests malalts van rebre la prescripció de $7,1 \pm 1$ cmH₂O de CPAP, amb un compliment mitjà de 6 ± 2 h/nit.

Els principals canvis associats al tractament amb CPAP en els pacients amb OS són els següents:

L'AHI ha passat de $50,1 \pm 23$ a 5 ± 4 e/h ($p < 0,001$), la saturació mitjana d'oxigen durant la nit ha augmentat de $79,1 \pm 7$ a $90,5 \pm 3$ % ($p = 0,005$), la saturació mínima d'oxigen durant la nit ha augmentat de $61,5 \pm 9$ a $83,1 \pm 6$ % ($p = 0,005$), el T90 ha disminuït de $82,8 \pm 27$ a $28,7 \pm 29$ ($p = 0,005$) i, per acabar, la ESS ha disminuït de $12,6 \pm 4$ a 5 ± 4 ($p = 0,005$).

Taula XII.3.:

Comparativa Paràmetres del Son pre- i post-CPAP:

	SAHS				Overlap			
	Pre		Post		Pre		Post	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
AHI (events/h)	76,6	30	3 ^{***}	4	50,1	23	5 ^{***}	4
SaO₂ mitjana (%)	84,1	4	93,1 ^{**}	2	79,1	7	90,5 ^{**}	3
SaO₂ mínima (%)	63,9	13	87,7 ^{**}	4	61,5	9	83,1 ^{**}	6
T90 (%)	77,3	13	7,9 ^{**}	13	82,8	27	28,7 ^{**}	29
ESS	16	4	9 ^{**}	4	12,6	4	5 ^{**}	4

* p = 0,05; ** p = 0,01; *** p = 0,001

* Indica diferències pre- i post-CPAP

M = Mitjana

SaO₂ = Saturació arterial d'oxigen

SD = Desviació estàndar

SaO₂ mitjana = Mitjana de medicions de SaO₂ durant la nit

Pre = PreCPAP

SaO₂ mínima = Mínima SaO₂ durant la nit

Post = PostCPAP

T90 = Temps per sota del 90% de la SaO₂

AHI = Índex d'apnees-hipopnees

ESS = Escala de somnolència d'Epworth.

XII.1.4. Morfometria muscular.

A la taula XII.4 es poden observar els valors de la morfometria muscular del M. intercostal extern abans i després del tractament amb CPAP.

Grup SAHS.

Després del tractament amb CPAP s'observa un canvi en els percentatges fibril.lars. En concret, el tant per cent de fibres de tipus I (%M1) disminueix del $54,2 \pm 12$ al $43,8 \pm 16$ % ($p=0,05$). Els canvis en el percentatge de fibres tipus II són en sentit contrari.

En els pacients amb SAHS no hem evidenciat cap efecte significatiu de la CPAP pel que fa al tamany de les cè.lules musculars del M. intercostal extern.

Pel que fa a l'espai ocupat per les fibres musculars (variable calculada que pondera l'àrea que ocupen les cè.lules tenint en compte alhora el tamany i els percentatges fibril.lars) hem observat tendències clares. Concretament, l'espai ocupat per les fibres de tipus I mostra una tendència a disminuir després del tractament amb CPAP (1136 ± 553 vs $759 \pm 351 \mu\text{m}^2$, $p=0,09$). Per contra, l'espai ocupat per les fibres de tipus II té una tendència a augmentar (934 ± 309 vs $1282 \pm 700 \mu\text{m}^2$, $p=0,07$).

Grup OS.

En els malalts amb OS no hem trobat cap efecte de la CPAP sobre els percentatges fibril.lars o sobre el tamany de les fibres de tipus I.

Per contra, el tamany de les fibres de tipus II, mesurat per la seva àrea, mostra una marcada tendència a augmentar després d'aplicar el tractament amb CPAP (1681 ± 725 vs $2307 \pm 814 \mu\text{m}^2$, $p=0,08$).

No hem trobat canvis pel que fa a l'espai ocupat per les fibres de tipus I o de tipus II.

Taula XII.4.:

Comparativa Morfometria dels M. intercostals pre- i post-CPAP:

	SAHS						Overlap			
	Pre			Post			Pre		Post	
	M	SD		M	SD		M	SD	M	SD
% fibres M1	54,2	12	%	43,8 *	16		61,2	14	58,3	14
% fibres M2	45,8	12	%	56,2 *	16		38,8	14	41,7	14
Area M1	2111	774	μm^2	1779	574		1909	470	2209	719
Area M2	2037	680	μm^2	2287	1047		1681	725	2307	814
Espai ocupat M1	1136	553	μm^2	759	351		1155	352	1273	325
Espai ocupat M2	934	309	μm^2	1282	700		686	466	1000	662

* p = 0.05 entre valor basal i post tractament

M = Mitjana
 SD = Desviació estàndar
 Pre = PreCPAP
 Post = PostCPAP
 % fibres M1 = Percentatge de fibres tipus I
 % fibres M2 = Percentatge de fibres tipus II
 Àrea M1 = Àrea mitjana de les fibres tipus I
 Àrea M2 = Àrea mitjana de les fibres tipus II
 Espai ocupat M1 = Espai ocupat per fibres tipus I
 Espai ocupat M2 = Espai ocupat per fibres tipus II

XII.1.5. Estudi de l'expressió gènica de les cadenes pesants de miosina.

A la taula XII.5 s'observen els valors de l'expressió de les diferents isoformes de MyHC a nivell del M. intercostal extern, prèviament al tractament amb CPAP i després d'aplicar-lo.

Grup SAHS.

No s'han observat diferències significatives en cap de les 3 isoformes de MyHC estudiades.

Grup OS.

Hi ha una certa tendència a disminuir l'expressió de MyHC – I ($1,44 \pm 0,78$ vs $0,92 \pm 0,46$ u.a., $p=0,17$) després del tractament amb CPAP. No hi ha diferències pel que fa a les isoformes de les fibres ràpides.

XII.1.6. Estudi de l'expressió gènica de les citocines i dels seus receptors.

La taula XII.6 mostra l'expressió a nivell muscular de les quatre citocines analitzades i dels receptors de TNF, abans i després del tractament.

Grup SAHS.

S'observen diferències significatives pel que fa a la expressió de IL-6, que disminueix de $0,76 \pm 0,42$ a $0,51 \pm 0,26$ u.a. després d'aplicar la CPAP ($p=0,04$), i a la IL-10, que augmenta de $0,33 \pm 0,13$ a $0,66 \pm 0,35$ u.a. ($p=0,02$). No es produeixen canvis rellevants pel que fa a l'expressió de IL-1, TNF, ni en els dos receptors del TNF.

Grup OS.

L'única dada digne d'esment és la tendència a minvar que presenta l'expressió del TNFr2 ($p=0,11$). La resta dels mediadors de la inflamació estudiats no mostren canvis amb la CPAP.

Taula XII.5.:

Comparativa Expressió Cadenes Pesants de Miosina pre- i post-CPAP:

	SAHS				<i>Overlap</i>				
	Pre		Post		Pre		Post		
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	
MyHC – I	<i>u.a.</i>	2,72	2,70	2,11	1,03	1,44	0,78	0,92	0,46
MyHC – IIa	<i>u.a.</i>	0,15	0,11	0,14	0,14	0,06	0,08	0,04	0,03
MyHC – IIx	<i>u.a.</i>	0,15	0,10	0,12	0,13	0,06	0,06	0,05	0,05

MyHC – I = Cadena pesant miosina de fibres tipus I
 MyHC – IIa = Cadena pesant miosina de fibres tipus IIa
 MyHC – IIx = Cadena pesant miosina de fibres tipus IIx
 u.a. = Unitats arbitràries

Taula XII.6.:

Comparativa Citocines i Receptors de TNF pre- i post-CPAP:

	SAHS						Overlap					
	Pre			Post			Pre			Post		
	M	SD		M	SD		M	SD		M	SD	
IL-1	<i>u.a.</i>	0,034	0,024	0,041	0,026		0,033	0,018		0,049	0,049	
IL-6	<i>u.a.</i>	0,76	0,42	0,51 *	0,26		0,49	0,38		0,48	0,23	
TNF	<i>u.a.</i>	0,46	0,21	0,61	0,35		0,34	0,16		0,33	0,27	
TNFr1	<i>u.a.</i>	2,91	2,40	2,07	2,25		1,38	1,19		1,19	0,81	
TNFr2	<i>u.a.</i>	2,30	1,36	2,29	2,56		2,17	1,13		1,77	1,11	
IL-10	<i>u.a.</i>	0,33	0,13	0,66 *	0,35		0,35	0,16		0,41	0,14	

* p = 0,05; ** p = 0,01; *** p = 0,001

* Indica diferències pre- i post-CPAP

IL-1 = Interleucina 1

IL-6 = Interleucina 6

IL-10 = Interleucina 10

TNF = Factor de Necrosi Tumoral *alfa*

TNFr1 = Receptor 1 del TNF

TNFr2 = Receptor 2 del TNF

u.a. = Unitats arbitràries

XII.2. RESUM DE RESULTATS. PART 2. EFECTE DEL TRACTAMENT AMB CPAP.

Globalment considerats els efectes de la CPAP en la població estudiada són molt evidents en els paràmetres del son, menys rellevants (encara que presents) en la força muscular, tant respiratòria com perifèrica, i poc importants pel que fa a la funció respiratòria diürna. El tractament amb CPAP sembla tenir un efecte sobre el remodelatge fibril·lar del M. intercostal i un efecte positiu sobre algun dels mediadors de la inflamació a nivell muscular en els pacients amb SAHS.

De forma més concreta, respecte a la funció respiratòria, els pacients amb SAHS tractats amb CPAP mostren una lleugera milloria en els paràmetres que mesuren la funcionalitat de la via aèria. Els malalts amb OS també milloren alguns paràmetres de la seva capacitat funcional pulmonar després de ser tractats amb CPAP. Com a fet interessant, en el grup OS s'observa una tendència a la milloria en les resistències de la via aèria i en els paràmetres d'atrapament aeri.

Pel que fa a la força muscular perifèrica i dels MMRR, els pacients amb SAHS tenen tendència a millorar la PEM després del tractament. Els malalts amb OS presenten un increment en els valors de la PIM i de la força de la mà no dominant, així com una marcada tendència a l'augment en els seus valors de la PEM i de la força de la mà dreta (dominant).

Tanmateix, la tolerància a l'exercici no millora en cap dels dos grups de pacients tractats.

Tal com era previsible, la totalitat dels paràmetres del son milloren de manera important, en els dos grups estudiats, després del tractament amb CPAP.

Quant a la morfometria muscular, el percentatge de fibres de tipus I del grup SAHS disminueix després d'instaurar el tractament. Entre les restants variables hi ha diverses tendències, entre les que destaquen que els pacients amb OS mostren una tendència a l'increment en l'àrea de les fibres de tipus II quan s'els hi aplica el tractament amb CPAP.

L'expressió de les MyHC no es modifica significativament amb la CPAP.

A nivell del M. intercostal extern dels pacients amb SAHS, el tractament amb CPAP sembla tenir un cert component antiinflamatori, doncs produeix un descens en l'expressió local de IL-6 (citocina proinflamatòria) i indueix un augment de la IL-10 (antiinflamatòria). No es troben canvis significatius en l'expressió de citocines en el grup OS, encara que hi ha una tendència a la disminució del TNFr2.

Podríem dir que els canvis provocats per la CPAP són una mica més marcats en el grup OS que en el SAHS pel que fa a la força muscular. Per contra, la CPAP sembla induir modificacions més importants quan s'avaluen els fenotips fibril·lars i els mediadors de la inflamació en els MMRR dels pacients amb SAHS.

XII.3. ADDENDUM DE RESULTATS. PART 2.

Com pot apreciar-se a la taula XII.7., el tractament amb CPAP, aplicat als dos grups d'intervenció repetidament assenyalats (pacients amb SAHS i malalts amb OS), no ha modificat l'expressió gènica de hemoxigenasa -1, ni de cap de les isoformes de l'òxid nítric sintetasa estudiades. Tampoc hem trobat canvis significatius en els nivells d'expressió del gen de la leptina a nivell del M. intercostal extern.

Taula XII.7.:

Comparativa entre les isofomes de NOS, pre- i post-CPAP:

	SAHS				Overlap				
	Pre		Post		Pre		Post		
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	
HO - 1	u.a.	1,41	1,65	0,81	0,61	0,43	0,22	0,38	0,27
iNOS	u.a.	0,022	0,01	0,029	0,02	0,018	0,01	0,017	0,01
eNOS	u.a.	2,97	1,29	3,15	1,75	1,67	0,69	1,75	0,78
nNOS	u.a.	2,62	1,15	2,96	2,25	0,99	0,67	0,74	0,44
Leptina	u.a.	0,90	0,74	0,68	0,80	2,56	3,66	1,74	2,03

NOS = Òxid Nítric Sintetasa

HO-1 = Hemoxigenasa 1

u.a. = Unitats arbitràries

iNOS = Òxid Nítric Sintetasa induïble

eNOS = Òxid Nítric Sintetasa endotelial

nNOS = Òxid Nítric Sintetasa neuronal

XIII. RESULTATS. PART 3.**XIII.1. CORRELACIONS.**

Només es descriuen a continuació aquelles associacions significatives entre variables que ens semblen rellevants conceptualment i que mereixen ser comentades a l'apartat de Discussió. Entre parèntesi es detallen el coeficient de correlació ("r") i la significació estadística ("p").

Quan no s'especifiqui el contrari les variables citades correspondran als seus valors basals (abans del tractament amb CPAP). Tanmateix, en els pacients que han rebut tractament amb CPAP (grups SAHS i OS) s'han definit variables de quantificació de canvi, és a dir, les que corresponen als canvis percentuals provocats pel tractament amb CPAP (entre els valors "pre-" i "post-CPAP"). Els noms d'aquestes variables van precedits per la lletra grega "delta" (Δ).

En aquest apartat de la tesi, per tal de fer més entenedores les relacions, s'han anat repetint les descripcions de les variables, malgrat estiguessin ja definides la primera vegada que es citaven al text.

XIII.1.1. Grup Obesitat.

Mesures antropomètriques. Associacions d'interès amb altres variables.

S'ha trobat correlació directa entre l'índex de massa corporal (BMI) i la presència d'obstrucció/restricció representat pel quocient FEV₁/FVC ($r= 0,884$; $p= 0,008$) (Figura XIII.1), i l'expressió del gen de la leptina ($r= 0,886$; $p= 0,008$), que és l'únic gen lligat al metabolisme que s'ha avaluat a nivell muscular a la present tesi.

Funció respiratòria. Associacions d'interès amb altres variables.

En els individus obesos hi ha una correlació entre el FEV₁ i l'àrea de les fibres tipus II (areaM2) a nivell del M. intercostal ($r= 0,841$; $p= 0,02$) i l'àrea fibril.lar global ($r= 0,792$; $p= 0,03$), que comprén totes les fibres musculars.

Morfometria. Associacions d'interès amb altres variables.

La grandària de les fibres de tipus I, expressada per l'àrea de les fibres tipus I (areaM1) correlaciona directament amb la de les tipus II (areaM2) ($r= 0,778$; $p= 0,04$) en el M. intercostal extern del subjectes amb obesitat.

També hem trobat una correlació directa entre el fenotip fibril.lar, expressat pel percentatge de fibres de tipus II (%M2) i, tant amb el pes ($r= 0,769$; $p= 0,04$), com amb la superfície corporal ($r= 0,803$; $p= 0,03$).

Inflamació. Associacions d'interès amb altres variables.

S'ha trobat una correlació negativa entre l'activitat inflamatòria, expressada en aquest cas com l'expressió de TNF-alfa (TNF) al M. intercostal i el grau d'hipoxèmia nocturna, avaluada per la saturació mitjana d'oxigen durant la nit (satmed) ($r= - 0,934$; $p= 0,006$) (Figura XIII.2). Així mateix, hi ha una associació directa entre l'expressió de

TNF i l'expressió de les cadenes pesants de una isoforma ràpida miosina , la MyHC-IIa ($r = - 0,930$; $p = 0,002$).

Quant a l'activitat inflamatòria a nivell cel.lular, s'ha observat una correlació directa entre el nombre de leucòcits i el nombre de macròfags per superfície de teixit muscular (leucos i macròfags/mm², respectivament) ($r = 0,872$; $p = 0,02$), i una correlació negativa entre el nombre de leucòcits a nivell del M. intercostal (leucos/mm²) i el grau de saturació d'oxigen nocturna (satmed) ($r = - 0,924$; $p = 0,025$) (Figura XIII.3).

Correlacions en el grup Obesitat - I

Figura XIII.1.:

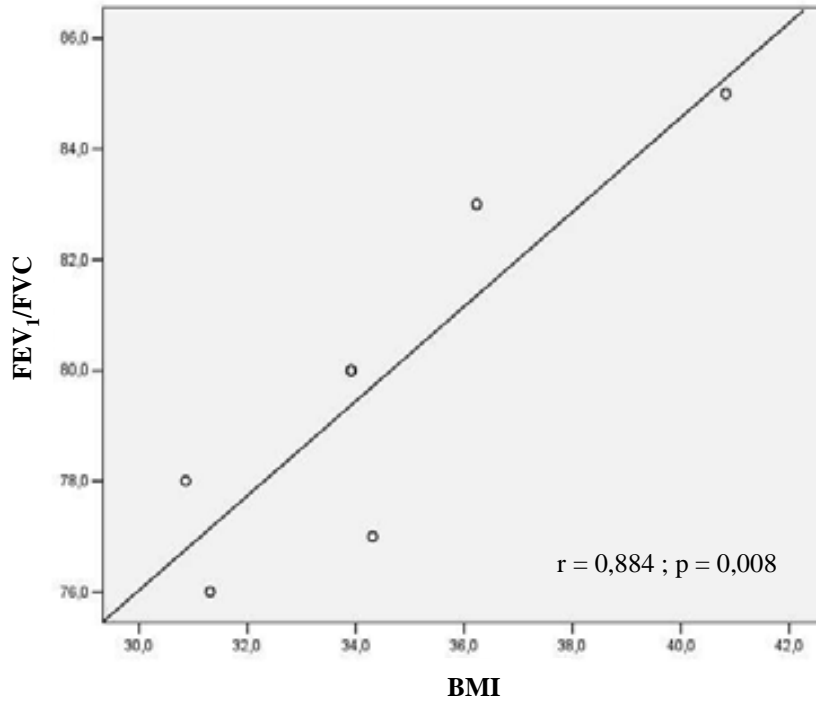
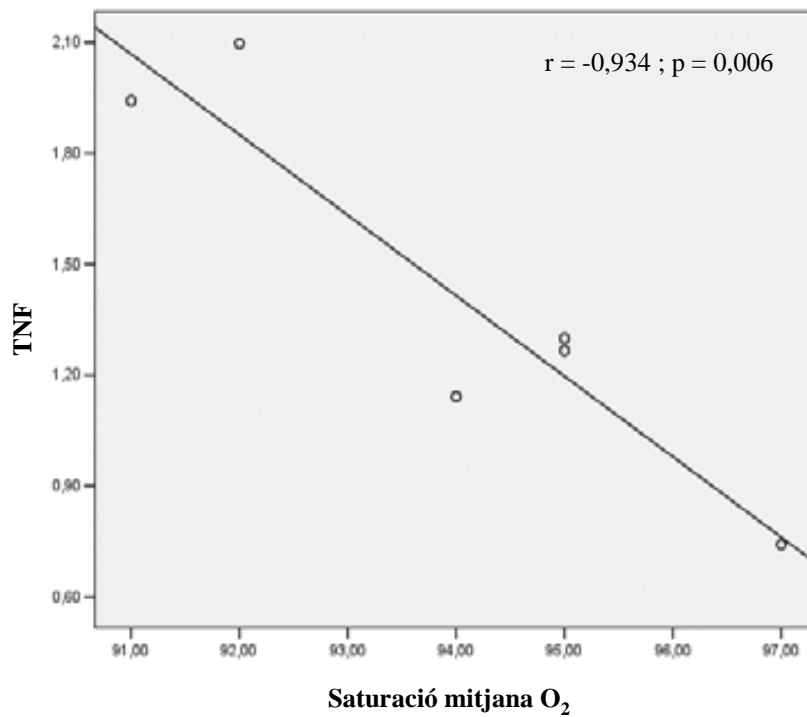
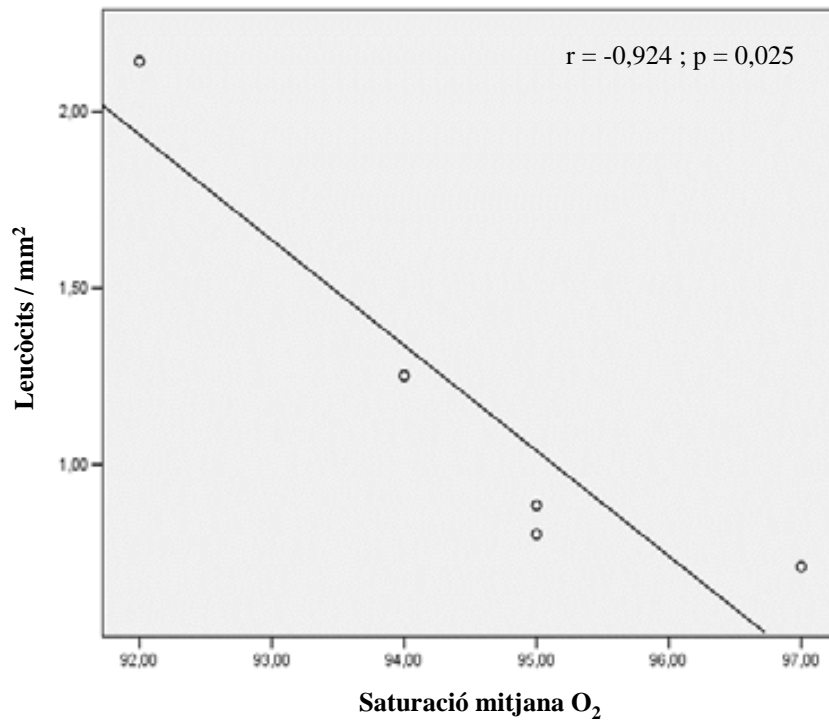


Figura XIII.2.:



Correlacions en el grup Obesitat - II

Figura XIII.3.:



XIII.1.2. Grup MPOC.**Mesures antropomètriques. Associacions d'interès amb altres variables.**

No es va trobar cap correlació d'interès entre les variables estudiades.

Funció respiratòria. Associacions d'interès amb altres variables.

No s'han trobat correlacions que mereixin ser esmentades.

Morfometria. Associacions d'interès amb altres variables.

En els pacients amb MPOC existeix una correlació negativa entre el grau d'obstrucció expressat pel %FEV₁ i el percentatge de fibres de tipus I (%M1) ($r = -0,653$; $p = 0,04$) (Figura XIII.4).

Per contra, hi ha una correlació positiva entre el tamany de les fibres, avaluada per l'àrea que correspon a les fibres de tipus I (areaM1 calculada) i la FRC ($r = 0,707$; $p = 0,02$) (Figura XIII.5).

Inflamació. Associacions d'interès amb altres variables.

Hem trobat una correlació inversa entre el grau d'inflamació cel·lular, avaluat pels leucos/mm² i el quocient DLco/VA ($r = -0,692$; $p = 0,04$), éssent aquest darrer un reconegut marcador d'emfisema pulmonar.

Tal com passava en els individus amb obesitat, hi ha una correlació directa entre els dos tipus de cèl·lules inflamatòries estudiades, els leucòcits (totals) i els macròfags per unitat de superfície ($r = 0,785$; $p = 0,007$) (Figura XIII.6).

Correlacions en el grup MPOC - I

Figura XIII.4.:

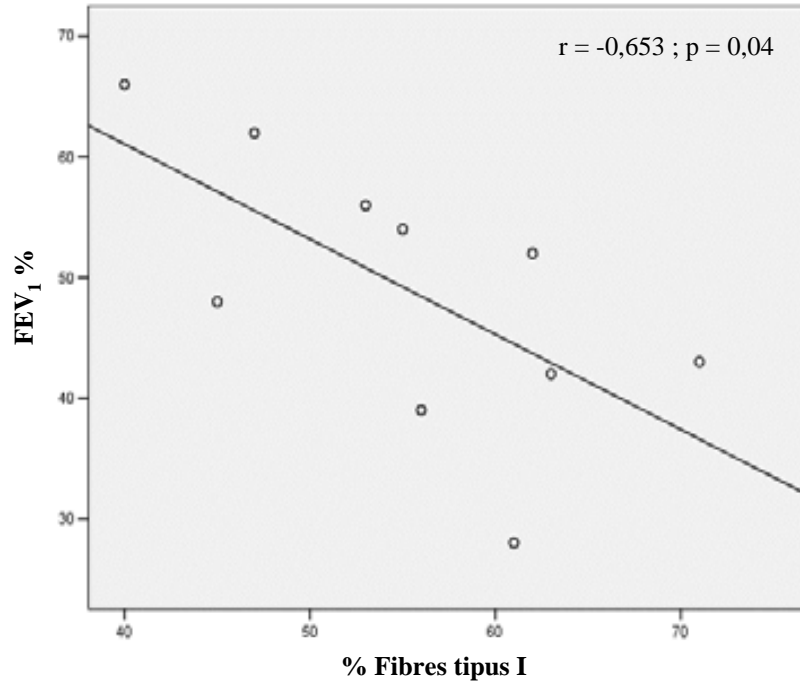
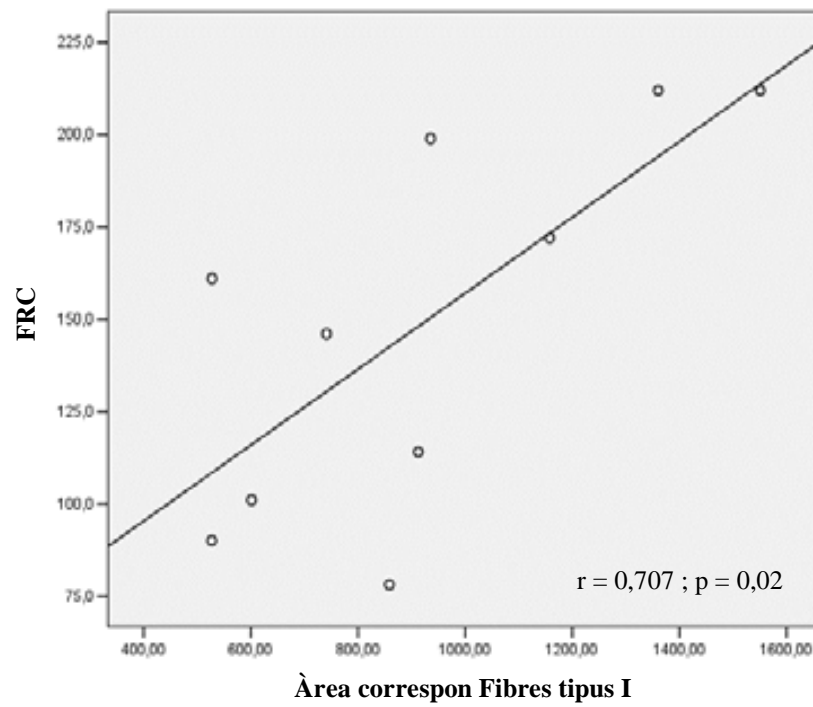
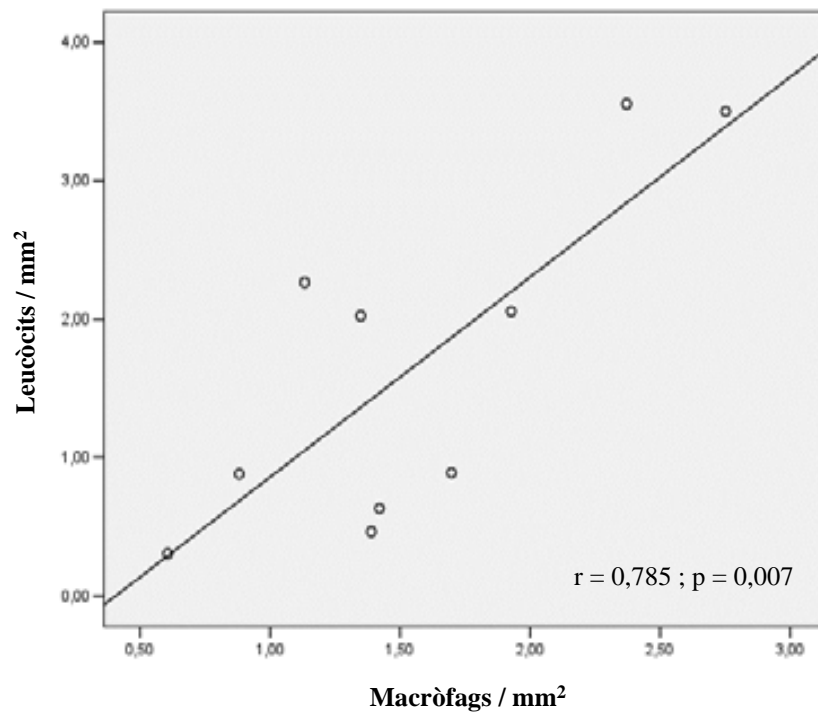


Figura XIII.5.:



Correlacions en el grup MPOC - II

Figura XIII.6.:



XIII.1.3. Grup SAHS.

Exposarem a continuació les dades corresponents als dos grups que han rebut una intervenció terapèutica (CPAP). Tant pel que fa als pacients amb SAHS com als OS hem dividit les correlacions en 2 subapartats. En primer lloc es descriuen les correlacions entre variables en situació basal, abans d'aplicar el tractament amb CPAP. En segon lloc es descriuen les correlacions que tenen relació amb l'efecte del tractament, en les que trobem les variables de canvi anteriorment definides.

XIII.1.3.1. Correlacions basals.

Mesures antropomètriques. Associacions d'interès amb altres variables.

En els pacients amb SAHS hi ha una correlació negativa entre el BMI i, tant la hipoxèmia diürna, mesurada per la PaO_2 ($r = -0,827$; $p = 0,003$) com la FRC ($r = -0,700$; $p = 0,02$), com a mesura de disminució dels volums pulmonars.

També s'ha trobat una correlació inversa entre la superfície corporal mesurada al començament de l'estudi i l'expressió de l'única interleucina estudiada que presenta activitat antiinflamatòria, la IL-10 ($r = -0,756$; $p = 0,01$).

Funció respiratòria. Associacions d'interès amb altres variables.

Únicament existeix una correlació directa i significativa entre un paràmetre que mesura l'atrapament aeri, el RV/TLC, i el percentatge de fibres de tipus I ($r = 0,812$; $p = 0,004$).

Tolerància a l'exercici i funció muscular. Associacions d'interès entre variables.

En els malalts amb SAHS hi ha una correlació directa entre la força a la mà dreta (Rhand) ($r= 0,642$; $p= 0,046$), que és la mà dominant, i la tolerància a l'exercici, avaluada pels resultats de la prova de la marxa durant sis minuts (6mwd).

També hem trobat correlació entre la força dels músculs inspiratoris, expressada en aquest cas per la pressió inspiratòria màxima (PIM) i l'expressió gènica de la MyHC-IIx ($r= 0,797$; $p= 0,006$), una de les dues isoformes ràpides i de contracció potent de les cadenes pesants de miosina (Figura XIII.7).

Estudi del son. Associacions d'interès entre variables.

Hem trobat una correlació negativa entre la saturació mitjana d'oxigen durant la nit (satmed) i el grau de hipersòmnia, mesurada pels valors de l'Escala de Somnolència d'Epworth postCPAP (ESSpost) ($r= - 0,874$; $p= 0,005$).

Morfometria. Associacions d'interès amb altres variables.

En els pacients amb SAHS hem trobat una correlació directa entre els diàmetres de les fibres de tipus I i el de les fibres de tipus II ($r= 0,846$; $p= 0,002$).

A nivell del M. intercostal extern, existeix una correlació entre el percentatge de fibres tipus I i, tant l'expressió de la IL-6 ($r= 0,676$; $p= 0,03$) (Figura XIII.8), com la del gen del receptor 2 de TNF (TNFr2) ($r= 0,794$; $p= 0,006$), ambdós gens vinculats a l'activitat inflamatòria.

Inflamació. Associacions d'interès entre variables.

Hem trobat correlació directa entre els nivells d'expressió del gen de la IL-1 i, tant el de la IL-6 ($r= 0,764$; $p= 0,01$) (Figura XIII.9), com el de la iNOS ($r= 0,842$; $p= 0,002$). Aquesta última també va relacionar-se directament amb l'expressió del gen de TNF ($r= 0,721$; $p= 0,02$).

Igualment, s'ha trobat una correlació recíproca intensa entre les altres dues isoformes de l'òxid nítric sintasa, la eNOS i la nNOS ($r= 0,839$; $p= 0,002$).

Per acabar l'apartat de correlacions en situació basal en el grup de pacients amb SAHS, vam trobar una correlació entre l'activitat inflamatòria a nivell molecular, mesurada pels nivells d'expressió del gen del receptor 1 del TNF (TNFr1) i el grau d'inflamació a nivell cel.lular, avaluada mitjançant el número de macròfags/mm² ($r= 0,802$; $p= 0,005$) (Figura XIII.10).

XIII.1.3.2. Correlacions. Efecte del tractament amb CPAP.

Mesures antropomètriques. Associacions d'interès amb altres variables.

No s'ha trobat cap relació d'interès.

Funció respiratòria. Associacions d'interès amb altres variables.

En els pacients amb SAHS, després de fer el tractament amb CPAP, els canvis produïts en la mesura del grau d'hipòxia diürna, avaluada mitjançant la PaO₂ (ΔPaO_2) correlacionen inversament amb els canvis produïts en la capacitat residual funcional (ΔFRC) ($r= - 0,786$; $p= 0,01$) i en l'atrapament aeri expressat pel quocient RV/TLC ($\Delta RV/TLC$) ($r= - 0,830$; $p= 0,006$).

Tolerància a l'exercici i funció muscular. Associacions d'interès entre variables.

El tamany de les fibres de contracció lenta, avaluat per l'àrea de les fibres de tipus I (areaM1) correlaciona amb els canvis observats en la PIM (Δ PIM) ($r= 0,739$; $p= 0,023$) després del tractament amb CPAP.

Estudi del son. Associacions d'interès entre variables.

En els pacients amb SAHS, la gravetat de la malaltia (expressada per l'AHI) presenta una correlació positiva amb el canvi en el percentatge de les fibres tipus I ($\Delta\%M1$) ($r= 0,719$; $p= 0,03$), i amb els canvis produïts en l'expressió gènica del TNF (Δ TNF) ($r= 0,751$; $p= 0,03$), una de les principals citocines proinflamàtores estudiades.

Existeix una correlació negativa entre l'activitat inflamatòria, mesurada per l'expressió del gen de TNF al M. intercostal ($r= - 0,682$; $p= 0,04$) i el canvi en la saturació mitjana nocturna (Δ satmed) després d'aplicar el tractament amb CPAP.

Un dels paràmetres que avalua el grau d'hipoxèmia durant la nit, la T90, presenta una correlació negativa amb els canvis produïts en l'expressió de la interleucina antiinflamatòria a nivell muscular, el Δ IL-10 ($r= - 0,744$; $p= 0,03$).

El temps que els pacients portaven la CPAP cada nit (CPAPtime) presenta una correlació inversa amb el canvi en el grau d'inflamació, mesurat per les modificacions en l'expressió de la IL-6 (Δ IL-6) al múscul ($r= - 0,720$; $p= 0,04$).

El grau d'hipoxèmia nocturna, avaluada per la saturació mínima d'oxigen durant la nit (satmin) mesurada abans de la intervenció terapèutica, presenta una correlació negativa amb els canvis produïts en l'expressió de IL-1 (Δ IL-1) després d'aplicar el tractament amb CPAP ($r= - 0,831$; $p= 0,01$).

Morfometria. Associacions d'interès amb altres variables.

En els malalts amb SAHS, els canvis produïts per la CPAP en el tamany de les fibres de contracció lenta, expressat per l'àrea de les fibres de tipus I (ΔareaM1) correlacionen amb els que s'observen a les fibres de tipus II (ΔareaM2) ($r= 0,833$; $p= 0,005$), de contracció ràpida.

Existeix una correlació directa entre els canvis en l'expressió gènica de la MyHC-I ($\Delta\text{MyHC-1}$) i els observats en l'àrea de les fibres homònimes ($\Delta\text{areaM1 postCPAP}$) ($r= 0,740$; $p= 0,04$) després del tractament (Figura XIII.11).

Hi ha una correlació positiva entre els canvis evidenciats després del tractament amb CPAP en l'expressió de MyHC-IIx ($\Delta\text{MHC-2x}$) i, tant els observats en l'àrea de les fibres tipus II (areaM2) ($r= 0,902$; $p= 0,002$) com els produïts a la PIM (ΔPIM) ($r= 0,780$; $p= 0,02$).

Inflamació. Associacions d'interès entre variables.

Per finalitzar la descripció dels efectes del tractament sobre els pacients amb SAHS, hem trobat que els canvis en l'activitat inflamatòria avaluada mitjançant l'expressió del gen de IL-1 ($\Delta\text{IL-1}$) correlacionen de manera negativa amb els canvis en la tolerància a l'exercici, mesurada per la distància caminada durant la prova de la marxa durant 6 minuts ($\Delta 6\text{mwd}$) ($r= - 0,872$; $p= 0,005$).

Els canvis produïts en l'expressió de TNF (ΔTNF) correlacionen amb els observats en l'estrès oxidatiu, mesurat per l'activitat de l'òxid nítric sintetasa induïble (ΔiNOS) ($r= 0,882$; $p= 0,004$) a nivell muscular (Figura XIII.12). Així mateix, aquests mateixos canvis en l'expressió de TNF (ΔTNF) es relacionen directament amb els observats en l'expressió del gen de les cadenes pesants de miosina tipus I ($\Delta\text{MyHC-1}$) ($r= 0,743$; $p= 0,035$), i amb els del percentatge de fibres homònimes ($\Delta\%M1$) ($r= 0,899$; $p= 0,002$).

Tanmateix, hem trobat una correlació directa recíproca entre els canvis en l'expressió gènica dels dos receptors de TNF (ΔTNFr1 i ΔTNFr2) ($r= 0,848$; $p= 0,008$) provocats per la CPAP (Figura XIII.13).

Per acabar, existeix una correlació directa entre el grau d'inflamació cel.lular, mesurat pel nombre de macròfags a nivell muscular i els canvis en l'expressió de IL-6 (Δ IL-6) ($r= 0,779$; $p= 0,02$) (Figura XIII.14), i per altra banda, la correlació és inversa amb els canvis produïts a la IL-10 (Δ IL-10) ($r= - 0,764$; $p= 0,03$) que, com ja hem comentat en altres paràgrafs, és la citocina antiinflamatòria estudiada en el present treball.

Correlacions en el grup SAHS - I

Figura XIII.7.:

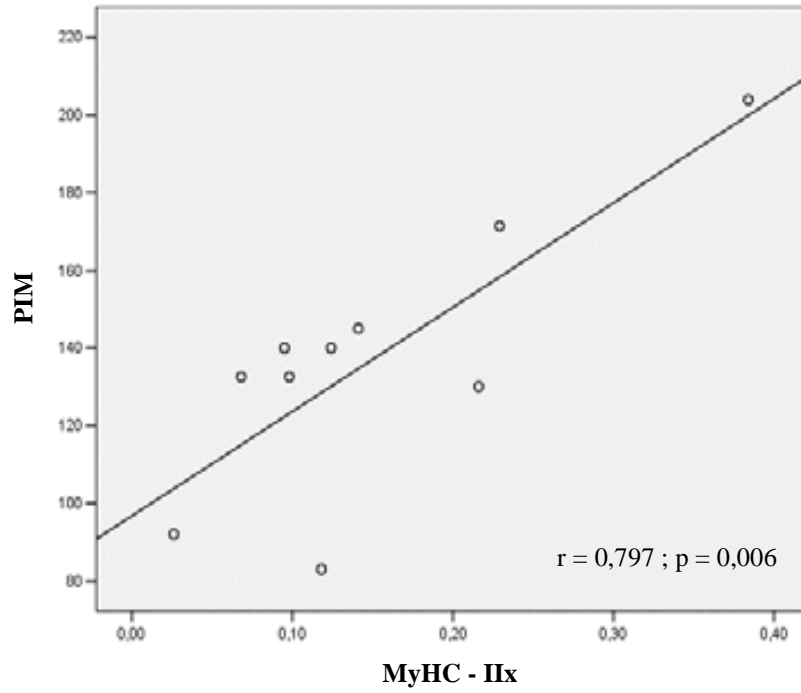
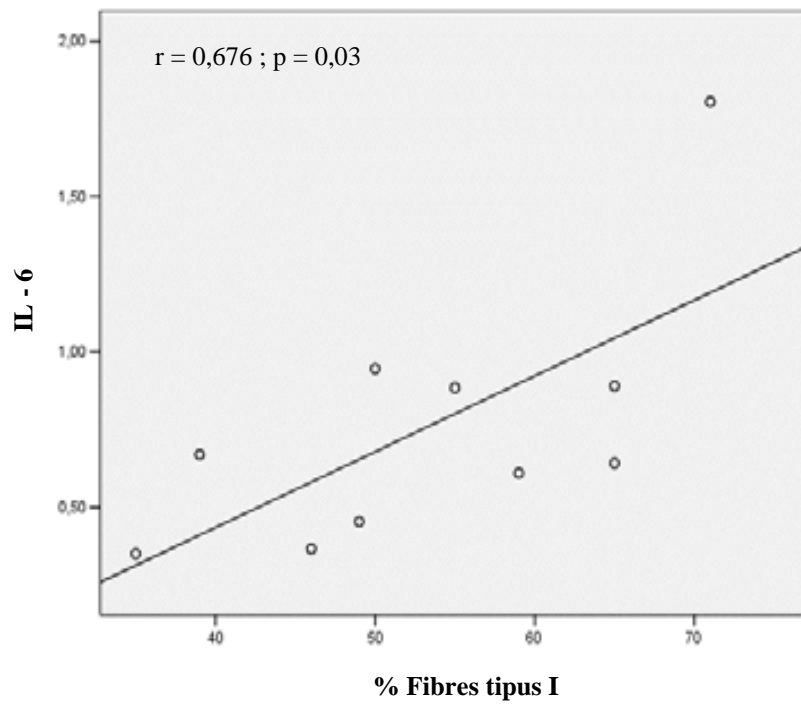


Figura XIII.8.:



Correlacions en el grup SAHS - II

Figura XIII.9.:

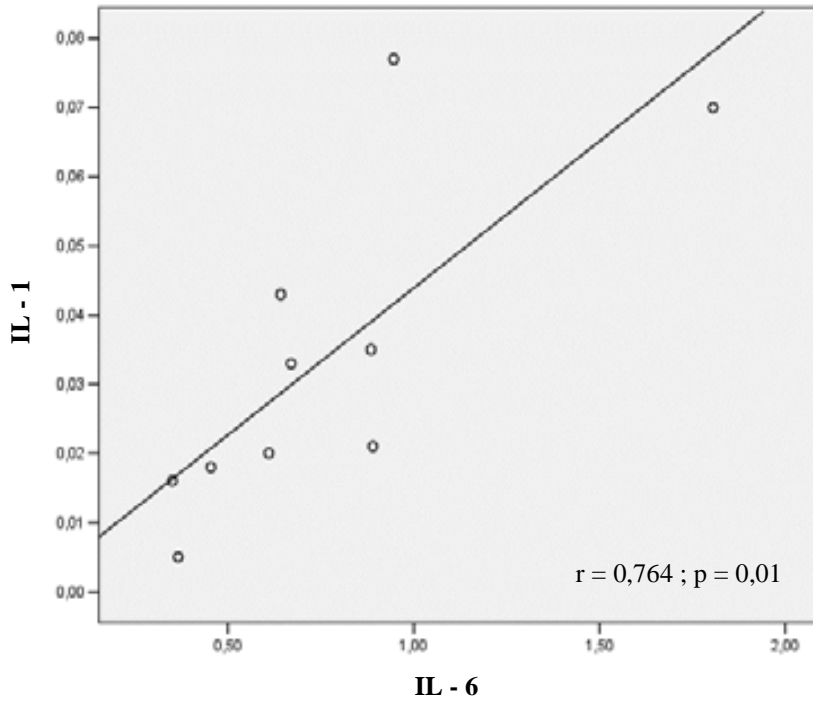
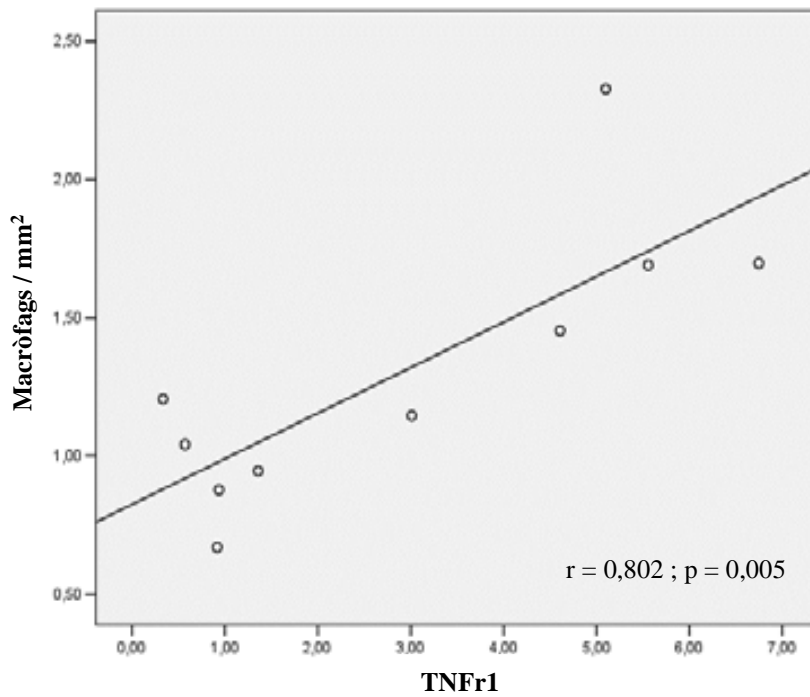


Figura XIII.10.:



Correlacions en el grup SAHS - III

Figura XIII.11.:

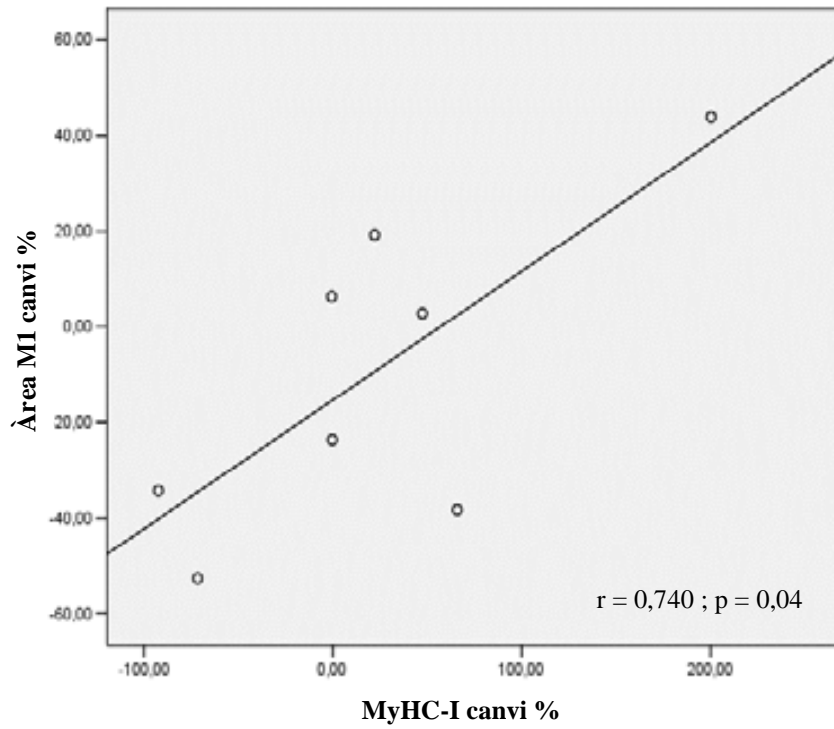
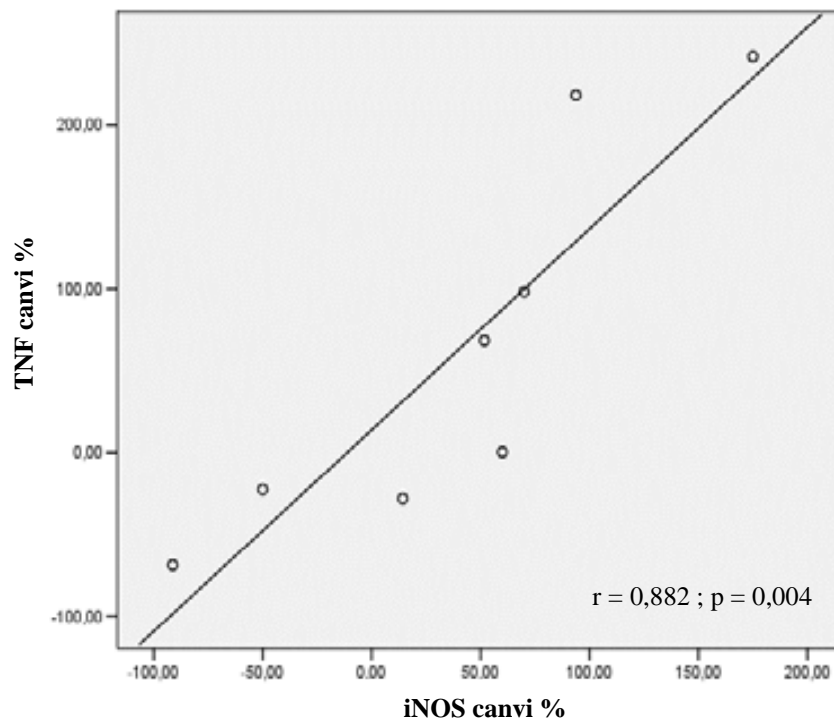


Figura XIII.12.:



Correlacions en el grup SAHS - IV

Figura XIII.13.:

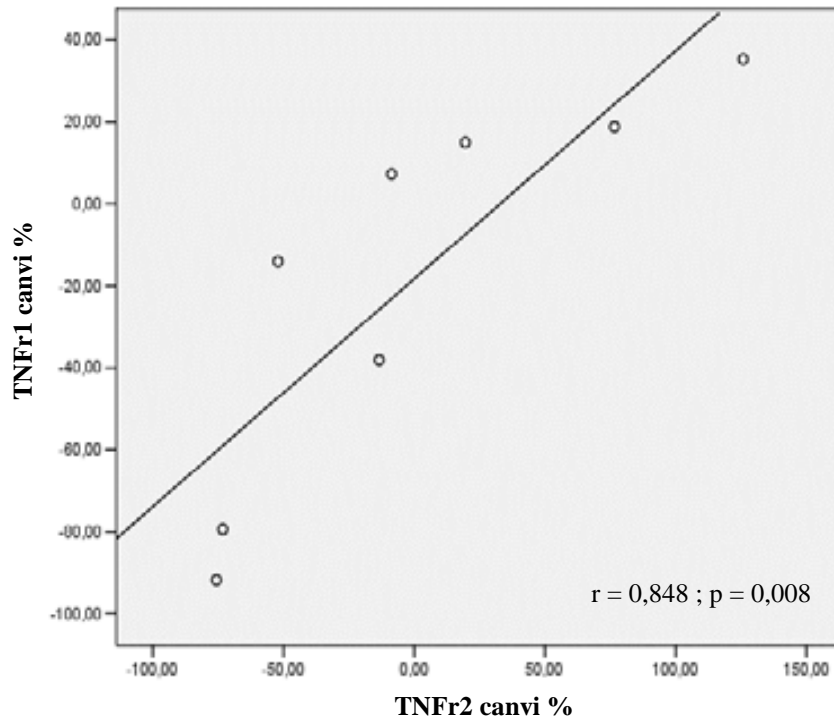
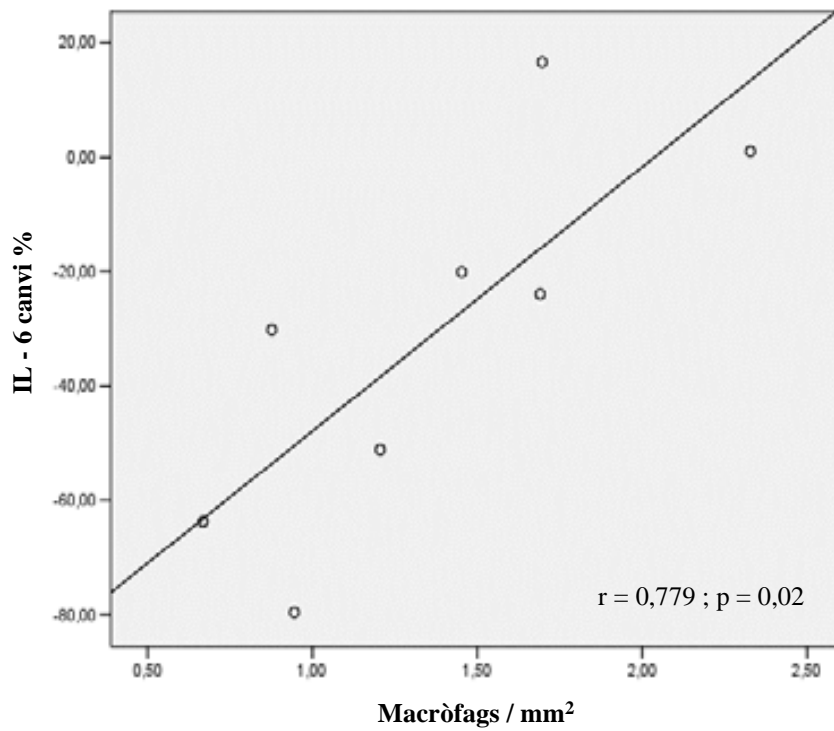


Figura XIII.14.:



XIII.1.4. Grup *Overlap*.**XIII.1.4.1. Correlacions basals.****Mesures antropomètriques. Associacions d'interès amb altres variables.**

No hi ha cap relació d'interès.

Funció respiratòria. Associacions d'interès amb altres variables.

Únicament cal destacar que l'atrapament aeri, expressat pel RV/TLC correlaciona directament amb un dels paràmetres que hem utilitzat per a avaluar l'activitat inflamatòria a nivell muscular, l'expressió gènica de TNF ($r= 0,635$; $p= 0,04$) (Figura XIII.15).

Tolerància a l'exercici i funció muscular. Associacions d'interès entre variables.

Cap correlació d'interès.

Estudi del son. Associacions d'interès entre variables.

No es va trobar cap associació d'interès, fora de les conegudes entre les diferents variables relacionades amb la gravetat de la malaltia (relacions evidents i abastament conegudes entre l'índex d'apnees-hipopnees i múltiples paràmetres de l'estudi polisomnogràfic).

Morfometria. Associacions d'interès amb altres variables.

Hi ha correlació recíproca entre els tamanys de les fibres de tipus I i II, expressats per les adalt esmentades àrees fibril.lars ($r= 0,709$; $p= 0,02$).

Inflamació. Associacions d'interès amb altres variables.

En els pacients amb OS, s'ha trobat una correlació negativa entre el nombre de leucòcits per unitat de superfície de múscul ($\text{leucos}/\text{mm}^2$) i el tamany de les fibres, expressat pel seu diàmetre menor, tant de les tipus I (dM1) ($r= - 0,742$; $p= 0,01$) com de les tipus II (dM2) ($r= - 0,697$; $p= 0,025$).

Tanmateix, el nombre de macròfags ($\text{macròfags}/\text{mm}^2$) es relaciona inversament amb el tamany de les fibres de tipus II, expressat per la seva àrea (areaM2) ($r= - 0,637$; $p= 0,048$).

Sempre a nivell del M. intercostal, existeix una correlació entre l'expressió de la IL-1 i la de IL-6 ($r= 0,892$; $p= 0,001$), ambdues citocines proinflamatòries, i entre la mateixa IL-1 i l'expressió gènica de la iNOS ($r= 0,636$; $p= 0,048$), enzim que participa com a mediador de la resposta immunitària i, més concretament, en la citotoxicitat dels macròfags.

D'altra banda, els valors del receptor 1 de TNF (TNFr1) correlacionen amb la eNOS ($r= 0,769$; $p= 0,009$), la nNOS ($r= 0,878$; $p= 0,001$), i el grau d'hipersòmia, mesurat per la puntuació en l'Escala d'Epworth (ESS) ($r= 0,677$; $p= 0,03$).

El nivell d'expressió gènica del receptor 2 de TNF (TNFr2) correlaciona amb l'expressió del gen de la leptina ($r= 0,751$; $p= 0,01$).

Finalment, pel que fa al estrès oxidatiu, els nivells d'expressió de la eNOS correlacionaven amb els de la nNOS ($r= 0,817$; $p= 0,004$). i amb el grau d'hipersòmia (ESS) ($r= 0,721$; $p= 0,02$).

XIII.1.4.2. Correlacions. Efecte del tractament amb CPAP.**Mesures antropomètriques. Associacions d'interès amb altres variables.**

Cap relació mostrava interès conceptual.

Funció respiratòria. Associacions d'interès amb altres variables.

No vam trobar correlacions d'interès.

Tolerància a l'exercici i funció muscular. Associacions d'interès entre variables.

En els malalts amb OS, els canvis induïts per la CPAP a la força de les dues mans, correlacionaven entre sí ($r= 0,808$; $p= 0,005$).

Els canvis que es produeixen en l'expressió de les cadenes pesants de miosina de contracció ràpida ($\Delta\text{MHC-2x}$) correlacionen amb els canvis en la força dels músculs inspiratoris, avaluats per la PIM (ΔPIM) ($r= 0,868$; $p= 0,002$).

Estudi del son. Associacions d'interès entre variables.

Els canvis observats en l'índex d'apnees-hipopnees (ΔAHI) correlacionen amb els canvis en la puntuació en l'Escala de Somnolència d'Epworth (ΔESS) ($r= 0,662$; $p= 0,04$) i amb els de la PaCO_2 (ΔPaCO_2) ($r= 0,655$; $p= 0,04$).

El grau de somnolència inicial dels pacients, mesurat per l'Escala de Somnolència d'Epworth (ESS) presenta una correlació negativa amb els canvis produïts per la CPAP en la força dels músculs respiratoris, avaluada mitjançant la PIM (ΔPIM) ($r= - 0,706$; $p= 0,02$); i amb els canvis observats en la força de les extremitats, mesurats per la força a la mà dreta (ΔRhand) ($r= - 0,788$; $p= 0,007$).

Morfometria. Associacions d'interès amb altres variables.

Els canvis presents en el tamany de les fibres de tipus I, expressat per l'àrea fibril·lar (ΔareaM1) correlacionaven amb els observats en les de tipus II (ΔareaM2) ($r= 0,926$; $p < 0,001$).

Finalment, els canvis produïts en la grandària de les fibres, mesurada per la seva àrea global ($\Delta\text{area global}$) correlacionaven amb els observats en la capacitat d'exercici dels pacients, expressada per la prova de la marxa durant sis minuts ($\Delta 6\text{mwd}$) ($r= 0,836$; $p= 0,005$).

Inflamació. Associacions d'interès amb altres variables.

Es van trobar relacions d'interès (correlació negativa) entre els canvis en l'expressió de la citocina proinflamatòria IL-6 ($\Delta\text{IL-6}$) i el percentatge de canvi de la saturació durant la nit, en concret amb la saturació mínima d'oxigen (ΔSatmin) ($r= - 0,730$; $p= 0,03$) (Figura XIII.16).

També hi ha una correlació directa entre els canvis induïts per la CPAP en l'expressió gènica de IL-6 ($\Delta\text{IL-6}$), i els observats en les dues altres citocines proinflamatòries avaluades en la present tesi doctoral, la IL-1 ($\Delta\text{IL-1}$) ($r= 0,860$; $p= 0,003$) i el TNF (ΔTNF) ($r= 0,734$; $p= 0,02$). Tanmateix, els canvis produïts en l'expressió d'aquesta darrera citocina (ΔTNF), presenten una correlació directa amb els observats en la IL-1 ($\Delta\text{IL-1}$) ($r= 0,960$; $p < 0,001$).

La proporció de canvi en l'expressió del receptor 1 de TNF (ΔTNFr1) correlacionava amb els canvis en l'expressió, tant de la iNOS (ΔiNOS) ($r= 0,942$; $p < 0,001$), com de la eNOS (ΔeNOS) ($r= 0,831$; $p= 0,005$), tots dos enzims amb possibles vincles amb la resposta immunitària.

D'altra banda, la proporció de canvi en l'expressió del receptor 2 de TNF (ΔTNFr2) correlacionava amb els canvis en l'expressió de la nNOS (ΔnNOS) ($r= 0,811$; $p= 0,008$); i amb els canvis que es produïen en l'expressió de les cadenes pesants de miosina, tant de la MyHC-I ($\Delta\text{MHC-1}$) ($r= 0,934$; $p < 0,001$) (Figura XIII.17), com de la MyHC-IIa ($\Delta\text{MHC-2a}$) ($r= 0,863$; $p= 0,003$).

El canvis observats en l'expressió gènica de la iNOS (Δ iNOS) correlacionaven amb els que es van constatar a la eNOS (Δ eNOS) ($r= 0,848$; $p= 0,004$), tot i que el seu nivell de significació es troba molt reforçat per un pacient amb valors molt alts de les dues variables (Figura XIII.18).

Correlacions en el grup OS - I

Figura XIII.15:

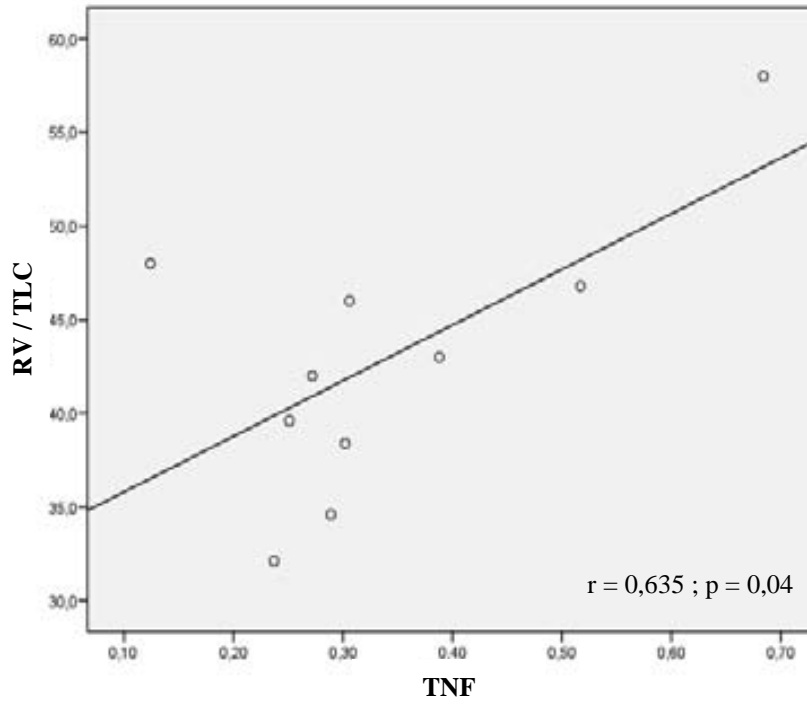
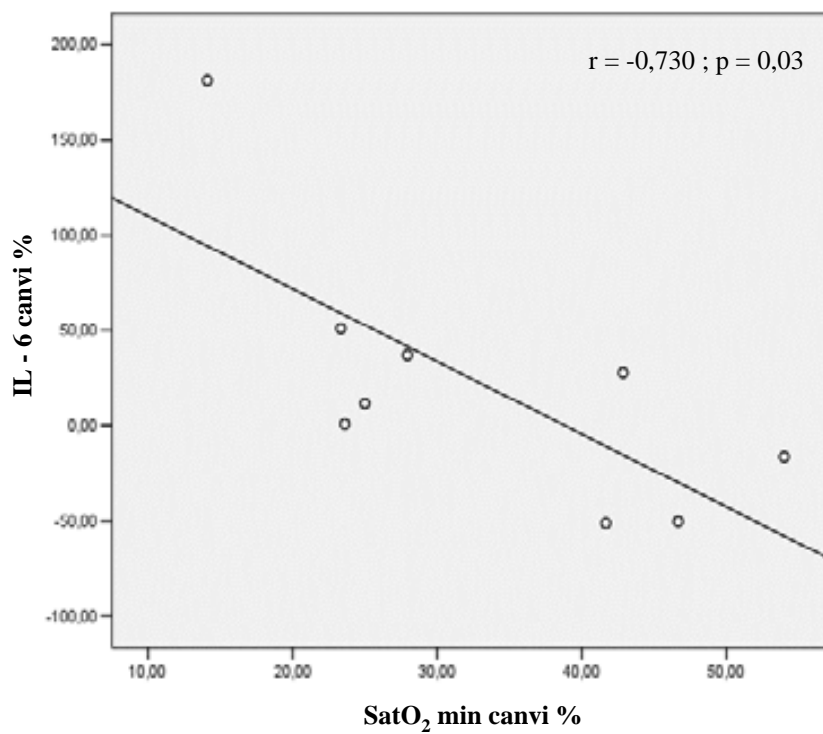


Figura XIII.16.:



Correlacions en el grup OS - II

Figura XIII.17.:

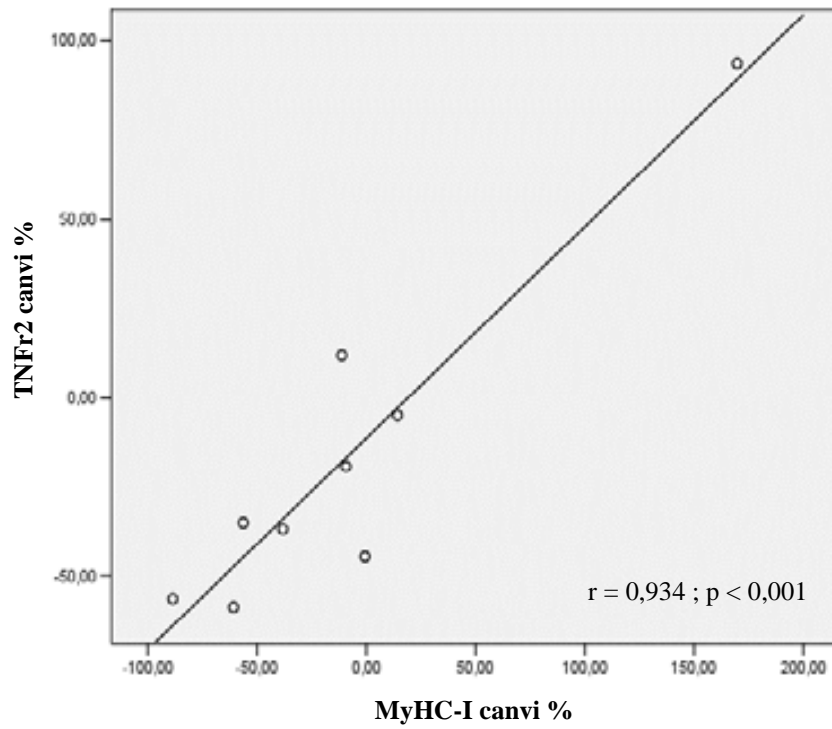
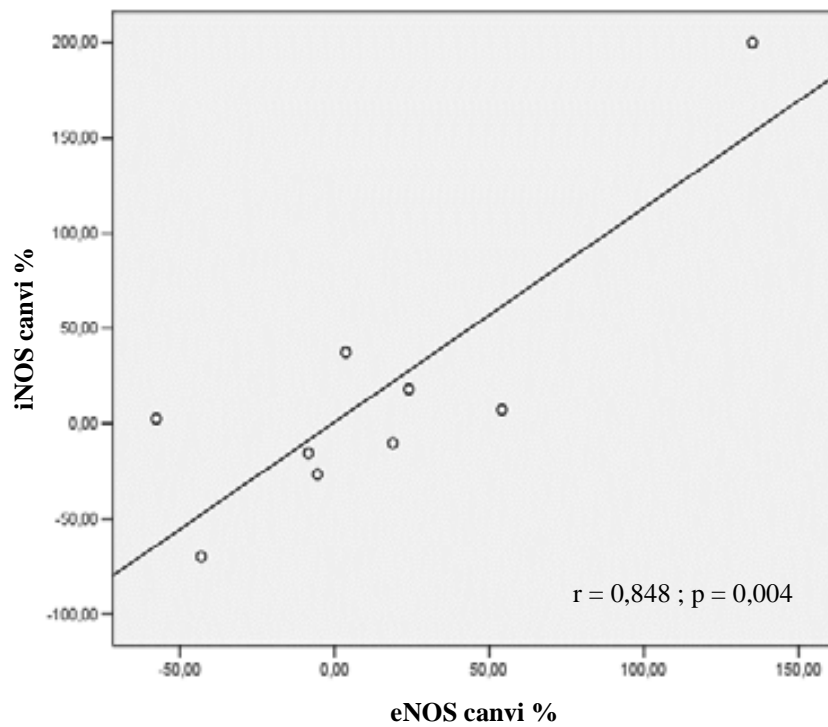


Figura XIII.18.:



DISCUSSIÓ

XIV. DISCUSSIÓ.

Abans d'entrar en l'exposició sistemàtica de la discussió hem de dir que una de les principals troballes del nostre estudi ha estat la presència de cèl·lules inflamatòries en totes les mostres de M. intercostal extern analitzades, i que el grau d'inflamació ha estat progressiu, éssent més discret en els subjectes sans i més pronunciat en els individus malalts. Aquest component inflamatori cel·lular a nivell del M. intercostal dels pacients amb SAHS, OS i MPOC s'acompanya de un augment de certs mediadors de la inflamació a nivell local. Una altra troballa important ha estat l'augment en el percentatge de fibres de tipus I en els pacients amb OS, amb la confirmació d'un canvi similar en els malalts amb MPOC. Els individus amb SAHS únicament mostraven una lleugera tendència en la mateixa direcció.

Pel que fa al tractament, considerem destacable que la CPAP, aplicada als malalts amb SAHS i OS, sembla tenir un cert efecte antiinflamatori i els millora alguns aspectes de la funció respiratòria diürna i de la força muscular respiratòria i perifèrica. Els seus efectes sobre l'estructura molecular del múscul són més discrets, fora d'una disminució discreta en el percentatge de fibres de tipus I en els malalts amb SAHS, però no als pacients amb OS.

Exposarem la discussió en diferents subapartats i en el mateix ordre en que es van descriure els resultats. Així, doncs, en primer lloc comentarem les troballes principals del nostre treball en els cinc grups estudiats en situació basal (individus sans, obesos sense comorbiditat, i pacients amb MPOC, SAHS i OS). Posteriorment, es faran els comentaris pertinents sobre l'efecte de la CPAP en els dos grups de malalts als qui s'els hi va aplicar: SAHS i OS. Per acabar, farem la interpretació de les associacions entre variables que considerem més rellevants.

XIV.1. MORFOMETRIA MUSCULAR.

XIV.1.1. Percentatges fibril.lars.

Hi ha un predomini de fibres musculars aeròbiques (de tipus I), de contracció lenta i més resistents a la fatiga, en el M. intercostal extern dels subjectes que pateixen alguna de les tres principals malalties estudiades (MPOC, OS i SAHS). En els dos primers grups, a més, el percentatge de fibres de tipus I és superior al dels subjectes sans. Semblaria, doncs, que aquest múscul respiratori en aquests pacients, que probablement ha de treballar més sovint i amb més intensitat que en els individus sans i, a més, en condicions d'un cert grau d'hipòxia, optimitzaria el seu metabolisme oxidatiu per tal de ser més eficient des d'un punt de vista energètic.

Com que el grup de subjectes obesos no mostra aquests canvis fenotípics, hom pensa que hi hauria un "efecte malaltia", independent de l'obesitat, que condicionaria aquestes troballes en els pacients amb SAHS i OS. També cal considerar que els pacients amb OS que, per tant, presenten dues malalties (MPOC+SAHS), tenen una marcada tendència a presentar més fibres de tipus I que els malalts que únicament pateixen una d'elles. Això fa pensar en uns certs efectes additius dels mecanismes fisiopatològics sobre els M. intercostals.

Si ens centrem en el grup amb **MPOC**, sembla coherent haver trobat un predomini de fibres de tipus I al M. intercostal extern d'aquests pacients. Éssent una línia d'investigació del nostre grup durant anys, en nombrosos estudis s'ha anat repetint aquest predomini de les fibres de tipus lent en aquest múscul (Gea 1996, Sauleda 1998, Jiménez-Fuentes 1998, Casadevall 2004, Martínez-Llorens 2008). Altres autors també han descrit el mateix a nivell del M. intercostal extern (Sánchez 1982, Hards 1990) o dels M. parasternals (Levine 2006). El mateix passa amb l'altre gran múscul respiratori, el diafragma, tal i com es comenta més avall. Per contra, en els M. de les extremitats i, més concretament en el quàdriceps, s'ha descrit un fenotip fibril.lar diferent, amb un predomini de fibres de tipus II en els pacients amb MPOC (Ramírez-Sarmiento 2002, Gosker 2003, Saey 2005).

Sembla ben establert que el diafragma dels pacients amb MPOC greu també té una proporció de fibres resistents a la fatiga (de tipus I) superior a les fibres de

contracció ràpida (de tipus II) (Ottenheim 2007). L'increment de la capacitat oxidativa i de la funció de transport d'electrons de la cadena mitocondrial dotaria al M. diafragma i a l'intercostal extern d'unes característiques idònies per a mantenir la seva funció de contracció muscular permanent. Aquest predomini de fibres de tipus I no es tan clar en els pacients amb malaltia moderada o lleu. El perfil en la distribució de fibres musculars observat en el diafragma dels malalts amb MPOC avançada podria representar una adaptació en front de l'increment crònic en el treball respiratori que té que suportar aquest múscul a mesura que la malaltia respiratòria progressa. Aquesta situació és similar al que s'observa quan els músculs esquelètics són sotmesos a programes d'entrenament de resistència (Caron 2009). Estudis transversals (*cross-sectional*) suggereixen que aquest desplaçament en el tipus de fibres musculars dels pacients amb MPOC succeeix abans en el diafragma que en el quàdriceps, la qual cosa podria indicar que els M. respiratoris (MMRR) presenten una major plasticitat que els M. de les extremitats (Doucet 2004).

Pel que fa als M. perifèrics dels pacients amb MPOC, en diferents estudis s'ha observat un increment de les fibres de tipus IIX del M. quàdriceps respecte a la població sana. La proporció de fibres de tipus II correlaciona inversament amb la gravetat de la MPOC. Aquesta tendència en la distribució de les fibres no es produeix en els músculs de les extremitats superiors, com el deltoides (Caron 2009). El predomini de fibres de tipus II es veu en estats que condicionen cert grau d'inactivitat, ja que les isoformes homònimes de miosina (MyHC-IIa i MyHC-IIX) s'expressen "per defecte" (Gea 1997). És el cas de la immobilització o la ingravidesa. El fet que només certs músculs perifèrics mostrin una desviació cap a les fibres musculars no oxidatives (de tipus II), juntament amb l'augment de les oxidatives (de tipus I) en els MMRR dels pacients amb MPOC, suggereix que els factors locals podrien ser responsables dels canvis fenotípics musculars. Dintre d'aquests factors locals hauriem de mencionar la inflamació, l'estrès oxidatiu i el grau d'activitat física, entre d'altres.

Dit d'una altra manera, els MMRR a la MPOC es caracteritzen per una certa sobreactivitat sota una geometria desfavorable, que semblen seguir-se d'una remodelació que els faria més resistents a la fatiga. D'alguna manera semblen adaptar-se a les condicions adverses en que treballen, desenvolupant un cert "efecte entrenament" (Gea 2009). Malgrat tot, aquests canvis a mesura que avança la malaltia podrien ser insuficients per a mantenir un treball ventilatori adequat. Per contra, els M.

perifèrics, i sobretot els de les extremitats inferiors, presenten una relativa inactivitat que condicionaria canvis involutius a nivell tròfic muscular, l'anomenat decondicionament, amb un patró histològic més vinculat a la manca d'ús, i que funcionalment es manifestaria amb una pèrdua de força muscular i una baixa resistència a la fatiga. Aquest sembla ser un dels mecanismes fonamentals en la limitació a l'exercici que pateixen els malalts amb MPOC.

Hom podria especular que, a nivell dels MMRR, en fases no gaire avançades de la malaltia, quan encara no s'han produït lesions estructurals difícilment reversibles, un programa d'entrenament, tant a nivell general com més específic pels M. ventilatoris, podria ser beneficiós. Si els MMRR ja disposen d'un fenotip parcialment adaptat, els programes de rehabilitació respiratòria haurien de ser útils no tan sols per a millorar encara més l'estructura per implementar la funció muscular, sinò també el sistema cardiovascular, la massa òssia, el grau d'inflamació associat a la malaltia i l'estat anímic dels pacients (Gea 2009). Així semblen corroborar-ho els estudis publicats en aquests darrers anys (Ramírez-Sarmiento 2002, Lacasse 2006).

En resum, hem vist com existeix una tendència oposada en la distribució de fibres musculars entre el diafragma i el quàdriceps dels malalts amb MPOC. Segons la nostra experiència (i aquest treball sembla corroborar-ho) el fenotip fibril·lar del M. intercostal extern es semblaria més al diafragma que no pas als M. de les extremitats inferiors. Això podria suggerir una major participació del M. intercostal en el treball respiratori dels pacients amb MPOC, i podria tractar-se d'un fenomen adaptatiu d'aquest múscul, per tal d'ésser més eficient.

Respecte a les altres malalties, **SAHS** i **OS**, no coneixem estudis previs sobre l'estructura dels MMRR que ens permetin fer comparances amb el realitzat pel nostre grup. Els primers treballs d'investigació sobre la SAHS es van centrar en la via aèria superior (VAS), que es considerava el lloc principal per explicar la fisiopatologia de la malaltia. Només amb posterioritat s'ha fet èmfasi en els aspectes sistèmics d'aquesta entitat. A nivell muscular es van estudiar els M. dilatadors de la VAS, descobrint que hi havia canvis en la funció contràctil d'aquests músculs. Així, es va descriure un fenotip de fibres musculars a nivell dels M. dilatadors de la VAS dels pacients amb SAHS, que bàsicament consistia en un desplaçament de les fibres lentes, amb alta capacitat oxidativa i resistents a la fatiga (fibres de tipus I) cap a fibres de contracció ràpida,

glicolítiques, amb capacitat de generar una força superior però que presenten una major predisposició a la fatiga (fibres de tipus II). Aquestes troballes s'acompanyen d'un patró de denervació a nivell dels M. dilatadors de la VAS, que podria explicar un empitjorament en la funció contràctil. Com a mecanismes per a explicar la disfunció muscular a nivell de la VAS dels pacients amb SAHS s'han invocat les càrregues mecàniques que impliquen els cicles repetitius d'obertura i oclusió de la VAS i la hipòxia. Tanmateix, el traumatisme mecànic que suposen els múltiples events oclusius i els roncs (vibració i tracció dels teixits) podrien empitjorar els efectes sobre els músculs degut a la inflamació i a l'estrès oxidatiu relacionat amb els cicles d'hipòxia i reoxigenació (Kimoff 2007). Certament, hi ha una considerable evidència d'una veritable miopatia a nivell dels M. de la VAS, amb canvis estructurals i disfunció muscular, que afavoririen el tancament de la llum de la faringe durant el son. Altres autors, però, qüestionen que l'afectació muscular a nivell dels dilatadors de la VAS sigui important en la fisiopatologia de la SAHS (Eckert 2007).

El fet d'observar la mateixa tendència en els MMRR de malalts amb SAHS que en els MPOC fa pensar que possiblement molts mecanismes que ho expliquin siguin similars (sobreesforç mecànic, inflamació, estrès oxidatiu, hipoxèmia i/o hipercàpnia, comorbiditat i canvis musculars vinculats a l'edat) (Gea 2008, Gea 2009). Altres factors que poden afectar la funció muscular serien diferents en totes dues entitats. Pels malalts amb MPOC podríem citar el dèficit de l'estat nutricional, els medicaments amb efectes secundaris musculars (corticosteroides) i, en molts casos, el tabaquisme. Pel que fa a la SAHS, mencionarem com a factors vinculats a l'afectació muscular més propis d'aquesta malaltia, l'obesitat, l'activació simpàtica i els efectes derivats directament dels trastorns del son.

És interessant remarcar, que el grup de pacients amb un major percentatge de fibres de tipus I és el OS. Com ja s'ha dit, potser en participar de dues malalties que condicionen hipòxia i sobrecàrrega mecànica, a més d'altres factors d'índole més molecular, es produirien efectes sumatius que provocarien una resposta muscular adaptativa més intensa.

XIV.1.2. Tamany de les fibres.

L'àrea de les fibres del M. intercostal dels individus obesos i dels pacients amb SAHS mostra una tendència (significativa en algú cas) a ser més gran que la dels subjectes sans. Aquest fenomen és, tanmateix, d'escassa magnitud, i podria estar relacionat amb els canvis en la síntesi de les diferents isoformes de miosina en front de diferents estímuls (veure més endavant).

XIV.1.3. Espai ocupat per les fibres.

Aquest és un índex que engloba tamany i percentatges de cada tipus fibril·lar. La superfície ocupada per les fibres aeròbiques (de tipus I) és més gran en els tres grups de malalts estudiats que a la població sana. També el grup d'obesos presenta una tendència a ocupar un major espai muscular que els sans. Hi hauria, doncs, uns efectes additius de les diferències en els percentatges i les tendències en els tamanys fibril·lars. La interpretació d'aquestes dades és molt semblant a l'expressada anteriorment, en parlar dels percentatges fibril·lars.

XIV.2. EXPRESSIÓ DELS GENS DE LES CADENES PESANTS DE MIOSINA (MyHC).

Cal destacar com els individus sans presenten una major expressió gènica de les isoformes ràpides de MyHC, sobretot de la més ràpida (MyHC-IIx), amb una menor expressió de la isoforma lenta (MyHC-I). *A priori*, serien els subjectes que amb menys freqüència reclutarien intensament els seus M. intercostals. Aquesta utilització ocasional dels seus MMRR podria condicionar un menor estímul per a la síntesi de MyHC-I (Gea 1997) i seria la causa de la menor proporció i tamany de les fibres de tipus I en relació als pacients.

Curiosament, els pacients amb OS mostren una baixa expressió gènica de MyHC-I. Però, alhora, és el subgrup que presenta una menor expressió de MyHC-IIa i IIx. Aquest baix nivell de transcripció dels gens de les diferents MyHC pot tenir efectes variables sobre les proporcions fibril·lars. Això no obstant, cal esmentar que la tècnica emprada per avaluar l'expressió gènica de MyHC en el present estudi (RT-PCR *en temps real*) no permet fer quantificacions absolutes "crués" de les còpies de RNA.

XIV.3. INFLAMACIÓ.

Fins on tenim coneixement, aquest és el primer estudi que avalua la presència de cèl.lules inflamatòries en un múscul respiratori, l'intercostal extern, tant en individus sans com en obesos i en pacients amb MPOC, SAHS i OS. Únicament el nostre grup d'investigació ha publicat recentment un treball en el que també es van quantificar les cèl.lules inflamatòries a nivell del M. intercostal de pacients amb MPOC greu (Casadevall 2009).

És important remarcar que una de les principals troballes d'aquesta tesi ha estat el constatar la presència de cèl.lules inflamatòries a nivell muscular respiratori en totes les poblacions estudiades. Es a dir, fisiològicament hi ha cèl.lules inflamatòries al M. Intercostal extern. Tanmateix, el seu nombre pot estar incrementat en determinades situacions. Així, el nombre de leucòcits és més alt en pacients amb SAHS, OS i MPOC; i el de macròfags a l'OS (amb tendències similars pel grup MPOC). A continuació discutirem aquestes troballes.

L'augment de cèl.lules inflamatòries a nivell muscular en els pacients amb sobrecàrrega mecànica i cert grau d'hipòxia pot respondre a la resposta inflamatòria davant la noxa (sobretot en els que més intensament combinen aquests mecanismes, que són els portadors de l'OS) (Aravindan 2007). Aquesta seria de petita quantia i sempre extrafibril·lar, ja que no es tracta d'un procés veritablement "miosític". D'altra banda, el paper jugat per aquestes cèl.lules inflamatòries podria estar relacionat amb els processos de dany, retirada de detritus i reparació, que sabem que es produeixen repetidament als MMRR (Orozco 2003, Casadevall 2007^b), i formarien part del seu procés de remodelatge.

Malgrat ser redundants voldríem insistir que en tots els grups estudiats hi ha cèl.lules inflamatòries a nivell dels M. intercostals, fins i tot en els individus sans. En cap mostra de teixit analitzat hem trobat "zero" cèl.lules inflamatòries. També és cert, com ja hem assenyalat més amunt, que en totes les malalties estudiades (MPOC, SAHS i OS) hi ha una presència augmentada de leucòcits a nivell muscular respecte als individus obesos i els sans. Dit això, cal precisar que aquesta presència de cèl.lules inflamatòries es molt lluny de semblar-se a un infiltrat cel·lular inflamatori fàcilment identificable amb el microscopi òptic. Hi ha "poques" cèl.lules, però estan presents.

L'absència de dades prèvies podria estar relacionada amb el fet que fins els darrers anys no es disposava d'anticossos monoclonals que permetessin fer una cerca acurada de cèl.lules inflamatòries aïllades. Darrerament, i utilitzant tècniques d'immunohistoquímica, s'ha descrit la presència de cèl.lules inflamatòries "residents" al costat d'altres cèl.lules que clàssicament es coneixia que es trobaven en els teixits. Aquestes cèl.lules tindrien una funció de vigilància immunològica i permetrien l'inici de la resposta inflamatòria. Tanmateix, la comunicació entre cèl.lules es veuria facilitada per la presència de mitjancers sol.lubles, les citocines, que serien sintetitzades i secretades tant per les cèl.lules inflamatòries com per les cèl.lules dels teixits (muscular, adipós...) i de la matriu extracel.lular (fibroblastes). Més concretament, en models animals ja s'havia descrit la presència de "macròfags residents". Sembla ser que en humans també hi hauria cèl.lules del sistema immune que habitarien o bé "patrullarien" en el teixit muscular, i que podrien ser les iniciadores de la resposta inflamatòria, en primera instància, sintetitzant i secretant citocines, que tanmateix servirien per activar i reclutar altres cèl.lules inflamatòries. Les mateixes citocines jugarien un paper en l'intercanvi d'informació entre les cèl.lules immunes i les fibres musculars.

Una troballa també destacable és l'augment en el nombre de cèl.lules inflamatòries que mostren les tres malalties estudiades respecte als subjectes sans. Això podria estar en relació amb els processos de lesió i/o inflamació local, relacionats amb diversos factors, entre d'altres, la sobreactivitat, la hipoxèmia, la inflamació sistèmica, etc... A banda de ser una expressió dels efectes deleteris, podria ser també un element indispensable per les tasques de reparació i remodelació muscular. Malauradament no hi ha estudis que incideixin en aquest punt.

Avui dia es considera que la SAHS i la MPOC són entitats proinflamatòries, i les nostres dades semblen confirmar aquest estat proinflamatori a nivell local, en el M. intercostal extern. No és estrany, doncs, observar que els malalts amb OS presentin més cèl.lules inflamatòries, doncs participen de les dues malalties, i és possible que ambdues entitats presentin efectes sumatoris quant a la reacció inflamatòria local i sistèmica.

També l'obesitat aïllada és considerada un estat proinflamatori. I en el M. intercostal dels individus obesos s'observa una tendència a una major presència de leucòcits que en els subjectes sans. El fet que les diferències amb els subjectes sans no siguin més grans, podria explicar-se perquè els individus inclosos en el grup de controls sans presenten un BMI superior a 25, la qual cosa els defineix com a subjectes amb sobrepès, encara que no arriben a ser obesos.

En els propers paràgrafs analitzarem els diferents estudis que han avaluat el component cel.lular de la inflamació en els músculs dels malalts amb MPOC i els compararem amb les nostres investigacions.

XIV.3.1. Inflamació cel.lular en el múscul a la MPOC.

Cal destacar tres estudis previs que han avaluat la presència de cèl.lules inflamatòries a nivell del múscul esquelètic de pacients amb MPOC. Dos ho varen fer a nivell del M. quàdriceps (Gosker 2003 i Montes de Oca 2005), i un tercer ho va fer a nivell del diafragma (MacGowan 2001). Com, els tres treballs ja han estat descrits en un altre apartat d'aquesta obra, apart de fer alguns comentaris sobre la metodologia, ens centrarem fonamentalment en dos aspectes dels mateixos:

1. Hi ha cèl.lules de tipus inflamatori en aquests músculs?, i
2. Quantes cèl.lules d'aquest tipus hi ha?

En primer lloc, comentar que trobem diferències metodològiques importants entre el nostre estudi i l'únic treball que fins ara havia investigat la presència d'inflamació cel.lular a nivell d'un múscul respiratori, el de MacGowan *i cols.* Tots dos utilitzem tècniques immunohistoquímiques per a identificar les cèl.lules inflamatòries. Però, MacGowan *et al.* fan servir un sol anticòs monoclonal i avaluen únicament la presència de macròfags (el Ber-MAC3; DAKO corp., Carpinteria, CA), mentre el nostre equip utilitza dos tipus d'anticossos, CD45 i CD68, per tal d'identificar respectivament tant els leucòcits com els macròfags.

D'altra banda, l'equip de MacGowan no fa referència a l'existència de diferències entre grups pel que fa a la quantificació de macròfags. La població estudiada era composta quasi exclusivament per pacients amb càncer als quals s'els hi va fer una toracotomia. En presentar els resultats sí que fan esment que el grau d'obstrucció a la via aèria, mesurat pel FEV₁ predit, no es trobava relacionat amb el nombre de macròfags per mm², el que podria suggerir que els pacients amb MPOC no tinguessin més cèl.lules d'aquest tipus que els controls amb funció pulmonar normal.

Tanmateix, MacGowan *et al.* capten les imatges dels macròfags amb una magnificació de 125 augments (x125) amb el microscopi òptic. Nosaltres ho hem fet a x400, amb la finalitat d'identificar amb la màxima precisió les cèl.lules inflamatòries en cada secció de teixit muscular. Aquest detall és també important, doncs en treballs metodològics previs, hem pogut observar que la magnificació utilitzada per a l'anàlisi pot modificar els resultats, i que probablement, la magnificació x125 és insuficient.

Ens assembla interessant remarcar la descripció del grup de MacGowan pel que fa a la distribució dels macròfags a les mostres de múscul diafragma: "Els macròfags es trobaven distribuïts a través de les capes de teixit connectiu de l'endomisi i perimisi. Només unes poques regions contenien dos o més macròfags molt propers entre ells, en àmplies zones de l'espai intersticial. No es va identificar cap macròfag a l'interior de les fibres musculars". A l'igual que en el nostre estudi, en cap moment es descriu la presència d'un veritable infiltrat de cèl.lules inflammatòries com succeeix, per exemple, a les polimiositis. Nosaltres sí que hem trobat cèl.lules inflammatòries, tant leucòcits com macròfags, però sempre "entre les fibres musculars".

El nombre de macròfags per fibra muscular del diafragma a l'estudi de MacGowan *et al.* era de $0,41 \pm 0,18$ (rang: 0,08 a 0,74), i el nombre d'aquestes cèl.lules per mm^2 de teixit de 52 ± 19 (rang: 18 a 85). Aquesta xifra és quelcom superior a la descrita en la present tesi, la qual cosa podria estar relacionada amb una major contribució contràctil i, per tant, amb la possibilitat de participar més en la resposta inflammatòria del M. diafragma, si el comparem amb el M. intercostal. També podria ser la conseqüència de la barreja de poblacions al treball del grup canadenc.

En el segon estudi, l'equip de Gosker (Gosker 2003) va avaluar la presència de cèl.lules inflammatòries en un múscul de les extremitats, el M. vast extern, de malalts amb MPOC. La identificació d'aquestes cèl.lules es va fer mitjançant immunohistoquímica, utilitzant els mateixos anticossos monoclonals que nosaltres, un contra l'antigen comú leucocitari (CD45) i un altre contra els macròfags (CD68). Malauradament, no es detalla el nombre de cèl.lules inflammatòries presents, ja que van ser avaluades semiquantitativament per mitjà d'un sistema de puntuació que anava de 0 a 5 i, a més a més, leucòcits i macròfags van ser comptats conjuntament. Hom pot deduir que la presència de leucòcits i macròfags a nivell muscular era escassa, doncs utilitzant aquesta escala semiquantitativa, cap dels pacients amb MPOC va arribar a tenir puntuacions iguals o superiors a 2. Més concretament, els quàdriceps de 12 pacients no mostraven cap cèl.lula inflammatòria, i 3 malalts només en presentaven *poques* (puntuació 1 a l'escala abans comentada). Novament la descripció d'aquests autors sembla corroborar les nostres troballes: "s'ha trobat una quantitat normal de macròfags i leucòcits, disposats a l'atzar entre les fibres musculars, tant en els subjectes control com en els pacients amb MPOC". No hi ha, doncs, infiltrats de cap

mena, però sí que es poden trobar cèl.lules inflamatòries. Malauradament, aquests autors no van estudiar cap múscul respiratori. És probable que les circumstàncies d'expressió de les cèl.lules al M. perifèric siguin molt diferents de les dels MMRR. Els primers probablement es troben sotmesos a factors locals derivats d'una reducció en l'activitat física. D'altra banda tots els grups musculars estarien condicionats per la inflamació sistèmica, la hipoxèmia i d'altres factors de tipus general.

Finalment, Montes de Oca *et al.* (Montes de Oca 2005) van estudiar diversos marcadors d'inflamació també en el M. quàdriceps femoral de malalts amb MPOC i els van comparar amb subjectes sans. Es descriuen els marcadors de cèl.lules inflamatòries en el múscul homogeneïzat: CD163 com a marcador de macròfags i CD159 per a les cèl.lules T. Però, només es van estudiar i quantificar els macròfags en una població reduïda (4 subjectes amb MPOC i 4 individus control). Amb aquest propòsit i, com en l'estudi del nostre grup, es va utilitzar una tècnica immunohistoquímica amb anticòs monoclonal anti-CD68. Refereixen que el nombre de macròfags és força superior als individus amb MPOC quan els comparem amb els sans (296 ± 98 vs 6 ± 3 cèl.lules per mm^3 , $p < 0,05$). També troben que els nivells en múscul de CD163 i TNF eren superiors en els malalts amb MPOC. Per acabar, en tots els pacients amb MPOC en que es van analitzar les mostres mitjançant microscopia electrònica també es van identificar macròfags. Cal esmentar que aquests autors expressen el nombre de macròfags per unitat de volum de teixit muscular (mm^3). Si comparem amb les nostres dades veurem que els nostres pacients amb MPOC presenten un major nombre de macròfags al M. intercostal que els pacients de Montes de Oca al seu quàdriceps. Donat el petit nombre de malalts en que es van identificar i quantificar els macròfags en l'estudi ressenyat, és aventurat voler treure conclusions. Però, potser els M. intercostals presenten un major component inflamatori cel.lular que els M. perifèrics de les extremitats. Les causes serien els elements diferencials anteriorment citats.

Si els 3 estudis fossin comparables, malgrat les diferències metodològiques, podríem dir que existeix un gradual increment del component inflamatori cel.lular que va dels M. de les extremitats, els M. intercostals i, finalment, el M. inspiratori per excel.lència, el diafragma. Tot i això, insistim, mai es tracta d'infiltrats semblants als de les malalties inflamatòries. El rol jugat per aquestes cèl.lules inflamatòries és incert.

Voldríem acabar aquest apartat sobre la inflamació cel.lular en els músculs dels pacients amb MPOC fent referència al treball abans esmentat del nostre grup d'investigació (Casadevall 2009), on es va estudiar la relació entre l'expressió de citocines i l'activació genètica de programes de reparació muscular a nivell del M. intercostal extern de pacients amb MPOC greu. De manera paral·lela es van quantificar les cèl·lules inflamatòries a nivell del teixit muscular, trobant-se un nombre relativament baix de les mateixes ($2,38 \pm 2,32$ per mm^2). Els gens lligats a la miogènesi avaluats van ser el *Paired box 7* (Pax7), la M-caderina i la Mio-D. Aquests es consideren factors que regulen la formació de nou múscul i que, per tant, participen en el procés de reparació muscular. En el mateix treball, l'expressió dels dos receptors de TNF analitzats es va relacionar directament amb les molècules clau de les vies de reparació abans mencionades. A més a més, l'expressió de TNFr2 presentava una relació directa amb la funció muscular inspiratòria (PIM sostenible). Per això, vàrem concloure que algunes citocines locals podrien participar en els fenòmens de reparació dels MMRR en pacients amb MPOC. Tanmateix, no vam observar relacions entre les cèl·lules inflamatòries i els factors de regeneració muscular.

En resum, hi ha dades a la literatura que suggereixen l'existència d'un procés inflamatori cel.lular a nivell muscular en pacients amb MPOC. El present treball vindria a confirmar aquestes dades però, per primer cop, a nivell d'un M. respiratori diferent del diafragma, el M. intercostal extern.

XIV.3.2. Inflamació cel.lular a la SAHS.

Nombrosos estudis han avaluat diferents aspectes de la SAHS i múltiples marcadors d'inflamació sistèmica (veure capítol d'Introducció) (Gozal 2008). Tanmateix, s'ha estudiat el paper de la inflamació sistèmica i les possibles relacions que presenta amb la MPOC, la SAHS i, més indirectament, amb l'OS (McNicholas 2009). Malgrat això, no hi ha cap treball previ, fora del nostre grup, que hagi avaluat la presència d'inflamació, tant cel.lular com humoral, a nivell dels MMRR dels pacients amb SAHS o amb OS.

Darrerament també s'han estudiat diferents cèl.lules inflamatòries presents en la sang perifèrica dels malalts amb SAHS. Més concretament, s'ha descrit l'activació de leucòcits polimorfonuclears a la SAHS, mitjançant la formació d'espècies reactives d'oxigen (ROS, de l'anglès "reactive oxygen species") i la sobreregulació del NF-kB (Dyugovskaya 2002, Htoo 2006). Amb posterioritat, s'ha documentat que els neutròfils de pacients amb SAHS presenten un endarreriment en l'apoptosi i un augment en l'expressió de molècules d'adhesió, la qual cosa incrementaria la vida mitjana dels neutròfils i podria perpetuar la potencial lesió tissular provocada per aquestes cèl.lules, que tenen la capacitat d'alliberar enzims proteolítics i produir ROS (Dyugovskaya 2008).

Però, no solament s'han estudiat els neutròfils dels pacients amb SAHS. També s'ha vist un increment en l'activació dels monòcits mediada per la hipòxia que, així mateix, es manifesta amb una expressió augmentada de molècules d'adhesió i una producció incrementada de ROS per part d'aquestes cèl.lules del sistema mononuclear-fagocític (Dyugovskaya 2002). En un altre treball (Minoguchi 2004) es va demostrar que la producció de TNF pels monòcits era significativament més alta en pacients amb SAHS moderada i greu respecte als controls sans, els obesos i els malalts amb SAHS lleu. El resultat suggereix que els monòcits eren activats per la hipòxia associada a les apnees. A més a més, el tractament amb CPAP feia disminuir la producció de TNF i, per tant, l'activitat dels monòcits.

Tanmateix, s'ha especulat que la hipòxia pot induir l'activació dels limfòcits en malalts amb SAHS. Més concretament, en pacients amb SAHS, s'ha descrit el fenotip i la funció d'un subgrup de cèl.lules T sanguínies, les cèl.lules T $\gamma\delta$ ("gamma delta"). Aquestes cèl.lules tenen la particularitat de recircular contínuament i migrar cap als teixits, constituint menys d'un 5 % de totes les cèl.lules T circulants en humans. Les cèl.lules T $\gamma\delta$, juntament amb els macròfags, infiltren la capa íntima de les artèries durant les fases inicials de l'aterosclerosi. Però també estan presents en molts altres teixits, havent mostrat capacitat citotòxica. Finalment, els limfòcits T $\gamma\delta$ s'han vist implicats en el dany a les cèl.lules endotelials dels pacients amb SAHS (Dyugovskaya 2003). En un altre estudi del mateix grup d'investigadors es va trobar que els limfòcits T CD8+ (citotòxics) dels pacients amb SAHS tenien unes característiques peculiars. La citotoxicitat d'aquests limfòcits T CD8+ es trobava augmentada en els pacients amb SAHS respecte als controls i depenia de la gravetat de la malaltia, mesurada per l'AHI.

Així mateix, el tractament amb CPAP nasal va fer disminuir l'activitat citotòxica de les cèl·lules T CD8+ (Dyugovskaya 2005).

De tots aquests treballs podríem concloure que s'ha objectivat una activació de les cèl·lules inflamatòries en sang perifèrica en els malalts amb SAHS. La majoria d'estudis s'han centrat en el paper que juguen aquestes cèl·lules en l'aterosclerosi, i en les interaccions entre els leucòcits i les cèl·lules endotelials. Hem vist, però, com les cèl·lules responsables de la resposta immune també es troben en molts altres teixits, incloent el múscul. Més encara, la pròpia fibra muscular té capacitat immunològica.

Hom podria especular que, de la mateixa manera que hi ha una activació de les cèl·lules inflamatòries en sang perifèrica i a nivell de la placa d'ateroma, podria existir una activació incrementada dels diferents subtipus de leucòcits a nivell dels músculs respiratoris dels pacients amb SAHS. La descripció feta en els darrers anys de la presència d'un subgrup de monòcits residents en diferents teixits fa les dades presentades en aquest treball especialment atractives. En el present i en altres estudis el nostre grup ha trobat la presència de cèl·lules inflamatòries en el M. intercostal dels malalts amb MPOC, SAHS i OS. Ja hem comentat que no formen un infiltrat inflamatori com succeeix a les miopaties inflamatòries o infeccioses. La presència de monòcits a nivell muscular podria suggerir que es tracta de cèl·lules centinella, que podrien ser les precursoras de la resposta inflamatòria a nivell local. Com ja hem comentat en un altre apartat, és difícil precisar si el paper que jugarien aquestes cèl·lules seria responsable del dany tissular o bé estaria implicat en els processos de reparació i ulterior remodelació del múscul. Probablement, intervindrien en ambdós processos. La relació entre la cèl·lula inflamatòria, la fibra muscular i els mediadors de la inflamació per elles elaborats és complexa, i es troba influenciada per múltiples factors. Fins que no disposem d'un coneixement més complet de tots aquests mecanismes i interaccions serà difícil de trobar noves eines terapèutiques que ens permetin guarir, modular, o prevenir la lesió muscular.

XIV.3.3. Inflamació cel.lular a l'OS.

Malgrat la inflamació sistèmica és present en les dues malalties en què participa l'OS (MPOC i SAHS), no ens constan estudis que hagin investigat el component cel.lular de la inflamació a nivell sistèmic o muscular en pacients amb OS. Fins ara, l'únic estudi que ha avaluat la presència de cèl.lules inflamatòries a la via aèria en malalts amb OS va objectivar un increment del nombre de neutròfils en aquest grup de pacients respecte als grups control d'individus sans i d'obesos, en les mostres obtingudes mitjançant esput induït. No varen trobar, però, diferències significatives en el nombre de neutròfils procedents de la via aèria entre els subjectes amb OS, MPOC i SAHS (Lacedonia 2011).

Ja s'ha comentat que entre els mecanismes implicats, directa o indirectament, en la resposta inflamatòria hi juguen un paper fonamental la hipòxia, la hipercàpnia, i l'estrès oxidatiu, entre d'altres. I sembla que alguns d'aquests factors es podrien trobar més alterats en els pacients amb OS. Més concretament, s'ha documentat una major hipòxia nocturna en pacients amb OS en comparació als malalts amb MPOC o SAHS aïllades. Tanmateix, la hipòxia intermitent i la fragmentació del son durant la nit provoquen una sèrie de respostes entre les que destaquen l'augment de l'activitat del sistema nerviós simpàtic, diverses alteracions metabòliques i també l'estrès oxidatiu i la inflamació sistèmica (McNicholas 2009). Els vincles entre la reacció inflamatòria i la presència d'aterosclerosi són inqüestionables, i aquesta darrera és la principal responsable de la malaltia cardiovascular, que condiona gran part de la morbiditat i la mortalitat d'aquests malalts. Estudis experimentals suggereixen que els pacients amb OS estan més predisposats a patir aterosclerosi que els individus amb MPOC o SAHS (McNicholas 2009). Fins ara, però, no hem trobat cap estudi que hagi investigat la inflamació sistèmica en els subjectes que pateixen alhora MPOC i SAHS, així com la possible interacció entre totes dues entitats en la resposta inflamatòria.

La complexitat de les relacions entre els múltiples factors que modulen la inflamació a nivell local i sistèmic fa que un esperable i hipotètic increment en la resposta inflamatòria dels pacients amb OS respecte a les altres dues entitats, hagi de ser confirmat en futures investigacions.

XIV.3.4. Citocines. Inflamació i antiinflamació a nivell molecular.

En general no hi ha grans efectes de les malalties estudiades i l'obesitat sobre els nivells d'expressió de citocines a nivell del M. Intercostal extern. Únicament destaquen un increment dels transcriptomes de IL-6 i TNF al grup d'individus amb obesitat, amb un increment de la segona en els pacients amb MPOC. També cal destacar que els subjectes amb SAHS i OS tenen uns nivells d'expressió de les diverses citocines inflamatòries inferiors als individus obesos sense comorbiditat.

D'altra banda, els M. intercostals dels individus sans mostren una major expressió gènica de IL-10 a nivell muscular que no pas els malalts amb SAHS i OS. S'observa una tendència semblant respecte als pacients amb MPOC. Semblaria, doncs, que a nivell del M. intercostal dels subjectes sans hi hauria una major presència d'aquesta citocina antiinflamatòria.

Així, doncs, els controls obesos presenten un cert augment dels mediadors proinflamatoris a nivell muscular. Aquesta darrera troballa és coherent amb les dades avui dia disponibles sobre l'obesitat. L'obesitat és considerada una malaltia on els mediadors de la inflamació hi juguen un paper molt important. L'adipòcit, a l'igual que la cèl.lula muscular, participa en la síntesi i en la secreció de les citocines, éssent fonamental per a la resposta inflamatòria les interaccions que es produeixen entre les cèl.lules del teixit adipós i les cèl.lules inflamatòries (macròfags, entre d'altres).

En el nostre treball, el grup de controls obesos és el que presenta una major expressió de totes les citocines testades, tant de les proinflamatòries com de les antiinflamatòries, la qual cosa podria significar una major activació del procés inflamatori en aquest grup d'individus. Tanmateix, s'ha descrit que els nivells circulants de TNF i IL-6 es troben elevats en els individus obesos i que aquestes citocines circulants disminueixen en perdre pes (Dempsey 2010). Desconeixem si existeix una relació directa entre els nivells circulants d'aquestes dues citocines i la seva expressió o troballa local a nivell d'un teixit concret com el muscular.

És interessant destacar que la major expressió de les citocines proinflamatòries en el M. intercostal dels individus obesos es produeix conjuntament amb una major expressió de l'única citocina amb activitat antiinflamatòria que hem estudiat, la IL-10.

Probablement hi ha un balanç i un equilibri dinàmic entre ambdues tendències, la de promoure i la de frenar la cascada inflamatòria, i el fet de trobar una major expressió de totes les citocines reflecteixi una activació simultània de tots els mediadors que participen en la resposta inflamatòria a nivell muscular.

No tenim una explicació clara per la menor expressió de citocines inflamatòries en obesos sense trastorns respiratoris durant el son respecte als que sí que els pateixen. Potser es trobi relacionat amb la modulació local que fan els diversos factors presents en aquestes últimes entitats a nivell dels MMRR.

Globalment considerat, trobem menys diferències en l'expressió de IL-1 que en el TNF, la IL-6 i la IL-10. La major "sensibilitat" d'aquestes darreres podria explicar-se per la seva major participació en diferents funcions a nivell del M. esquelètic en general i, potser també, en els MMRR. Això semblaria especialment cert al referir-nos a la IL-6, que és considerada la "miocina" per excel·lència. El fet que l'expressió de TNF és la que mostra unes diferències més pronunciades podria explicar-se pel paper funcional preponderant que té aquesta citocina dins de tots els biomarcadors inflamatoris. El TNF funciona com a mediador inicial de la inflamació, reclutant cèl·lules immunes per tal que alliberin quimiocines i altres citocines inflamatòries (Pajak 2008). Com més tard veurem, també en els processos de reparació muscular sembla jugar un paper central, tot i les redundàncies funcionals d'aquestes citocines.

XIV.3.4.1. Comentaris de discussió sobre les citocines. Interpretació dels resultats a la llum d'altres estudis.

La debilitat muscular és una troballa freqüent en pacients amb MPOC avançada i contribueix de manera significativa a la morbiditat i mortalitat de la malaltia, augmentant de 3 a 4 vegades el risc d'exacerbacions, hospitalitzacions i mort (Sin 2008). La disfunció muscular a la MPOC sembla ser més evident en els pacients amb la malaltia més avançada. Ja hem vist com l'afectació funcional muscular, així com els seus substrates estructural i metabòlic són heterogenis en cada un dels territoris musculars estudiats (músculs perifèrics o MMRR), el que sembla indicar que siguin el resultat d'una complexa interacció de múltiples factors (Gea 2009). Entre aquests

darrers ocupen un paper prominent la inflamació i l'estrès oxidatiu, tant en la seva expressió a nivell sistèmic com a nivell local.

En l'apartat d'Introducció hem descrit com la cèl.lula muscular participava en els processos inflamatoris. Molts estudis s'han centrat en els mecanismes capaços de provocar lesió muscular. Però, darrerament s'ha fet èmfasi en els potencials efectes positius de les citocines a nivell del dany muscular.

Recentment el nostre grup ha descrit un augment en les concentracions locals de determinades citocines proinflamatòries en els músculs intercostal extern i diafragma de malalts amb MPOC (Casadevall 2006, Casadevall 2007). En el cas de l'intercostal, l'expressió de citocines i dels seus receptors precedeix immediatament i es correlaciona en la seva intensitat amb l'activació de gens claus en la reparació muscular. Això no obstant, el rol d'aquestes substàncies i la seva interrelació amb altres processos segueix sent una incògnita (Casadevall 2007, Barreiro 2008).

Una de les citocines que més s'ha estudiat en relació als músculs és el **TNF**. En estudis experimentals ha estat implicada en la contractilitat i els fenòmens d'atròfia i regeneració muscular (Langen 2007). En els últims anys s'ha descrit un possible efecte ambivalent d'aquesta citocina. Si bé es cert que s'ha associat a alteracions en la massa i l'estructura dels músculs, hi ha estudis que suggereixen un efecte beneficiós del TNF en el remodelatge muscular.

Com hem apuntat més amunt, el nostre grup en comparar biòpsies de pacients amb MPOC amb subjectes sans va evidenciar un increment en l'expressió de citocines proinflamatòries, i en particular TNF, en els M. intercostals dels malalts amb MPOC (Casadevall 2007). Quina significació pot tenir aquesta troballa? El TNF contribueix a la disfunció muscular dels MMRR en pacients amb MPOC degut a un efecte lesiu vinculat a la seva acció proinflamatòria? O, ans al contrari, el TNF participa en la reparació i el remodelatge muscular i, per tant, juga un paper adaptatiu en els M. intercostals d'aquests pacients?

En un altre estudi del nostre grup (Barreiro 2008) vàrem trobar que el M. quàdriceps dels pacients amb MPOC presentava menys expressió de citocines proinflamatòries que el grup control. Més encara, l'expressió de TNF a nivell local

correlacionava positivament amb la funció muscular. Altres marcadors d'inflamació, com són el factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF) i els receptors de TNF presentaven la mateixa tendència. Els paràmetres relacionats amb l'estrès oxidatiu es trobaven més aixecats en els músculs dels pacients amb MPOC, i l'increment de la seva expressió a nivell local s'associava amb una menor força del M. quàdriceps. Globalment considerades aquestes dades suggereixen que la inflamació local, a nivell del múscul perifèric, podria no ser perjudicial pel manteniment de la integritat i funció muscular dels pacients amb MPOC, sinó que juguen un paper important en processos fonamentals per a l'estructura i funció del múscul.

Experimentalment se sap que algunes citocines, com el TNF i la IL-6, poden afavorir la proteòlisi i la disrupció fibril·lar, a més de condicionar directament alteracions en la contractilitat (Debigare 2001, Reid 2002). No obstant, també s'ha observat que la síntesi d'aquestes citocines i dels seus receptors augmenta després d'incrementar el treball del múscul o bé a l'induir lesió muscular (Pedersen 1998, Tomiya 2004, Vassilakopoulos 2004). És més, l'absència o bloqueig dels receptors de TNF evita la correcta reparació del múscul, doncs la seva activació resulta imprescindible per a la diferenciació miògena (Warren 2002, Chen 2005, Chen 2007). En un estudi recent del nostre grup, miòcits procedents de pacients amb MPOC són incapaços de diferenciar-se i formar miotúbuls si es bloqueja el receptor 1 de TNF (Pascual 2011).

Altres estudis experimentals han demostrat que nivells alts de TNF indueixen disfunció contràctil en el diafragma dels animals (Wilcox 1994, Li 2000). Per contra, les alteracions diafragmàtiques associades a la distròfia muscular es veuen atenuades en el ratolí amb dèficit de TNF (Gosselin 2003). D'altra banda les accions del TNF sobre la funció contràctil dels músculs de les extremitats són controvertides.

En tot cas, les causes i conseqüències de l'augment en l'expressió de TNF en els MMRR dels pacients amb MPOC són poc conegudes. En el treball de Casadevall *et al.* abans citat, l'increment en l'expressió de citocines proinflamàtiques en els M. intercostals de pacients amb MPOC s'acompanyava d'una tendència a observar més dany al sarcolemma de les fibres musculars. Aquest fet podria ser degut a que la expressió de TNF a nivell local podria estar involucrada en la lesió muscular, però

també en el procés de reparació. La natura transversal de l'estudi no permet deduir la direcció de causalitat.

Totes aquestes troballes aparentment contradictòries es podrien explicar pels diferents efectes provocats per les citocines depenent de les concentracions que assoleixin a nivell local i de la durada i del moment de l'increment de la seva expressió a nivell del múscul (Langen 2007). Així, s'ha vist que nivells baixos de TNF suposen un estímul per a la diferenciació i regeneració muscular, mentre que altes concentracions de TNF inhibeixen el procés de regeneració per la via del NF- κ B, que participa en el control del factor regulador miogènic MyoD. Alguns dels efectes beneficiosos del TNF a baixes concentracions en el procés de regeneració muscular podrien ser deguts a que afavoreix el reclutament de macròfags i neutròfils, així com la quimiotaxi de mioblasts. Els primers participarien en les fases inicials de la reparació muscular, fagocitant detritus i secretant citocines que reclutarien altres cèl.lules, i els darrers poden donar lloc a nou múscul *in vitro*.

Amb la informació precedent, semblaria que el TNF podria afectar els processos de remodelació-regeneració muscular de manera positiva o negativa, depenent del moment, la durada, la magnitud i la composició de la resposta inflamatòria. S'hauria d'avaluar en posteriors estudis si el comportament local de les altres citocines és equiparable al del TNF.

Centrem-nos ara en la **IL-6**. Fou la primera citocina que es va veure que era alliberada per les fibres musculars quan es contreien. Avui dia és considerada una veritable "miocina". Més encara, en els darrers anys s'ha vist que la IL-6 que deriva del múscul juga un important paper en el metabolisme cel.lular, influint també en el teixit adipós (Pedersen 2008). Durant l'exercici intens la concentració plasmàtica de IL-6 augmenta fins a assolir un pic al final de l'exercici o poc després. Els seus nivells plasmàtics poden pujar fins a cent vegades la concentració de IL-6 en situació basal. La magnitud de la pujada dels nivells de IL-6 s'ha relacionat amb la duració de l'exercici, la intensitat i la quantitat de massa muscular involucrada en el treball mecànic (Mathur 2008). La IL-6 és la primera citocina present en la circulació quan fem un l'esforç físic. L'augment dels nivells plasmàtics de IL-6 se segueix d'un increment en la concentració en sang de IL-10 (Pedersen 2009). El comportament del TNF és quelcom diferent. S'ha vist però, que hi ha una interacció entre el TNF i la IL-6,

doncs el TNF és un inductor de la secreció de IL-6. Alguns autors pensen que el TNF produït localment podria ser el responsable de l'increment sistèmic de IL-6 (Mathur 2008). En resum, la concentració de IL-6 en la circulació durant l'exercici és, de lluny, la més alta de totes les citocines alliberades pel múscul, i precedeix l'aparició d'aquestes últimes.

Inicialment es pensava que els nivells elevats de IL-6 eren deguts a la presència de dany muscular, perquè la concentració plasmàtica de IL-6 correlacionava amb els nivells de creatincinasa (CK), un marcador clàssic de dany muscular. En els darrers anys s'ha evidenciat que el dany muscular no és imprescindible per a trobar un increment de la IL-6 circulant quan es fa exercici (Pedersen 2009). Avui dia hi ha evidències de que la producció de IL-6 deguda a la contracció muscular (activitat física) és anterior en el temps a la producció de IL-6 relacionada amb el dany de les fibres musculars. És probable que la lesió muscular "per se" se segueixi de mecanismes de reparació que incloguin la presència de macròfags a nivell del múscul, i que aquests darrers secretin IL-6 (Febbraio 2002). Alguns autors proposen que entre els diferents factors que s'alliberen en les fases inicials del dany muscular i que són capaços d'estimular "in vitro" la proliferació de mioblasts es troba la IL-6 (Zeng 2010). Així doncs la IL-6 intervindria en els processos de reparació muscular.

Més encara, s'ha proposat un possible efecte antiinflamatori de la IL-6. De fet, s'ha demostrat que la IL-6 estimula la producció de citocines antiinflamatòries com la IL-1ra i la IL-10 (Steensberg 2003). Una activitat física moderada s'ha relacionat amb una disminució en els marcadors d'inflamació sistèmica. Els efectes beneficiosos de l'exercici regular s'han atribuït al seu efecte antiinflamatori. Tanmateix, també s'ha observat un increment en els nivells de IL-10 i altres molècules amb propietats antiinflamatòries durant l'exercici moderat (Pedersen 2009).

Nosaltres hem estudiat l'expressió local, a nivell muscular respiratori, de 4 citocines i els receptors de TNF, no pas els nivells plasmàtics. Potser això explicaria els valors relativament discrets de IL-6 detallats en el nostre estudi. Ja hem comentat com el TNF sembla ser la citocina proinflamatòria per excel·lència, i la seva importància a nivell local. Per contra, la IL-6, que és la citocina que més s'eleva en situacions d'exercici, no sembla tenir una participació tan important quan estudiem el seu comportament a nivell local. Potser la magnitud de la resposta muscular del M.

intercostal és insuficient per a detectar canvis més significatius en la IL-6. Tanmateix, aquest és un múscul amb poca massa muscular, i hem vist com existia una relació entre els nivells de IL-6 plasmàtica i la intensitat de l'exercici, la massa del múscul i el treball muscular per ell realitzat.

Ja hem assenyalat que la magnitud de l'expressió de les diferents citocines estudiades no permet la comparació entre elles degut a que la tècnica que hem emprat, la PCR en temps real, no permet donar valors absoluts sinó relatius. Per això, ens hem limitat a fer comparances entre els 5 grups d'individus estudiats per a cada citocina concreta.

Com s'ha comentat més amunt les troballes més significatives fan referència al TNF i a la IL-10. Hem vist com l'expressió local de TNF es troba incrementada en els pacients amb MPOC respecte als individus sans, i una tendència similar s'observa en els pacients amb SAHS. A més, els nivells d'expressió de IL-10 a nivell muscular respiratori són inferiors en els malalts amb SAHS i OS que en els subjectes sans. Aquests nivells més baixos d'expressió de IL-10 podrien resultar clarament perjudicials per als MMRR, sobretot si es combinen amb una major expressió de les citocines proinflamatòries. Potser la IL-10 pot contrarestar alguns dels efectes del TNF a nivell muscular, o bé limitar la seva sobreproducció. Tal vegada uns nivells adequats o fins i tot elevats de IL-10 podrien ser els que permetessin una bona funció dels MMRR malgrat tinguessin una important expressió gènica de IL-6 i TNF.

Podríem concloure que algunes citocines locals semblen participar no solament en el procés de lesió muscular, sinó també en la reparació dels MMRR en els pacients amb MPOC (Casadevall 2009) i potser amb SAHS, encara que en aquesta segona entitat manquen treballs que avaluïn el grau de lesió. Per tant, l'increment de la producció d'aquestes citocines a nivell local podria resultar, en última instància, beneficiós.

XIV.4. DISCUSSIÓ SOBRE ELS EFECTES DEL TRACTAMENT AMB CPAP.

Les principals troballes del present estudi pel que fa a la intervenció terapèutica (CPAP) són una disminució en el percentatge de fibres de tipus I en els malalts amb SAHS i un cert efecte antiinflamatori sobre els seus M. intercostals. També és rellevant la milloria d'alguns paràmetres de la força muscular respiratòria i perifèrica, així com de la funció respiratòria en els pacients amb OS.

El efectes sistèmics del tractament amb CPAP són ben coneguts, i han estat comentats en l'apartat d'Introducció. La SAHS ha estat vinculada de forma creixent a les malalties cardiovasculars. Darrerament, però, s'han publicat estudis a llarg termini investigant l'efecte de la CPAP sobre diferents malalties com la hipertensió arterial i l'íctus (Barbé 2010, Martínez-García 2009). El mecanismes que s'han propugnat per tal d'explicar la relació entre les malalties cardiovasculars i la SAHS han estat l'augment de l'activitat simpàtica, la disfunció endotelial i els processos inflamatoris. Aquests darrers també podrien estar implicats en una disfunció muscular a la SAHS.

XIV.4.1. Efectes de la CPAP sobre la funció respiratòria diürna.

Tant en els malalts amb SAHS com en els OS hi ha canvis en alguns paràmetres de funció respiratòria. En el grup SAHS millora el FEV₁ i la TLC després del tractament amb CPAP. La ventilació no invasiva podria resultar beneficiosa degut al seu component de disminuir la càrrega de treball dels MMRR i a optimitzar la funció del diafragma, fent que es contragui de manera més eficient.

En el grup OS, s'observa un increment en la FVC, així com una marcada tendència a la milloria en els paràmetres d'atrapament aeri. Novament, el component MPOC dels pacients amb OS sembla ser responsable de una resposta a la CPAP que presenta algunes diferències respecte als malalts amb SAHS pura.

En els dos grups de pacients tractats, tant la PaO₂ com la PaCO₂ diürnes presenten valors millors després del tractament amb CPAP. El fet que no assoleixin significació estadística podria venir donat pel nombre insuficient de pacients de la

nostra sèrie, amb una grandària de la mostra dissenyada per a la valoració de les variables biològiques musculars.

La MPOC es caracteritza per una pèrdua en la capacitat (retracció) elàstica pulmonar i el desenvolupament d'una limitació al flux espiratori que provoca un progressiu atrapament aeri amb un augment en el volum pulmonar al final de l'espiració, que s'anomena hiperinflació i s'acompanya d'un descens en la capacitat inspiratòria (Casanova 2005). Com a resultat, existeix una pressió positiva alveolar al final de l'espiració, que és coneguda com a PEEP intrínseca o PEEPi, de l'anglès "positive end-expiratory pressure". Això condiona un increment en el treball respiratori, un deteriorament en la funció dels músculs inspiratoris i un efectes hemodinàmics perjudicials per a l'organisme (Calverley 2005). La PEEPi augmenta proporcionalment a la magnitud de la limitació al flux aeri i la hiperinflació resultant. Quan els pacients amb MPOC (o amb OS) pateixen d'insuficiència respiratòria i necessiten de la ventilació mecànica, a l'aplicar PEEP en la modalitat de ventilació es contrarresta la PEEPi i, com a resultat, disminueixen les càrregues mecàniques respiratòries. Això pot explicar, en part, els beneficis de la CPAP en pacients amb MPOC descompensada. Més encara, Soares *et al.* van trobar que l'aplicació de CPAP a pacients amb MPOC moderada i greu en situació d'estabilitat clínica, augmentava la seva capacitat inspiratòria, fet que suggereix que disminuïa la hiperinflació (Soares 2008). Una cosa semblant pot haver passat en els nostres pacients amb OS.

A la MPOC la hiperinflació dinàmica (HD) està implicada en el desenvolupament de la dispnea i la limitació de la capacitat per fer exercici. En els darrers anys s'ha reconegut que la capacitat inspiratòria, com a eina per mesurar la HD, constitueix una variable de rellevància clínica i pronòstica en malalts amb MPOC (Casanova 2005). El principal mecanisme implicat en el desenvolupament de la HD a la MPOC és la limitació al flux espiratori (LFE). Aquesta darrera no solament es manifesta durant l'exercici, sinó fins i tot durant la respiració espontània en repòs. Donat que la LFE limita la velocitat de buidament pulmonar, afavoreix la HD.

El nostre grup ha participat en un estudi on es va objectivar una relació entre la disfunció dels M. espiratoris i la HD a la MPOC avançada (Mota 2009). En aquest estudi la resistència dels M. espiratoris va presentar una relació inversa amb la HD durant l'exercici. La funció dels M. espiratoris va ser un predictor independent de la HD. Les

dades suggerien que una millora en l'activitat de la musculatura espiratòria mitjançant programes específics d'entrenament muscular podria ser beneficiosa pels malalts amb MPOC, en part, degut a la disminució de la HD.

En contrast amb els pacients amb MPOC, Verin *et al.* van trobar que, en malalts amb SAHS sense evidència d'obstrucció intratoràcica, hi havia una correlació entre el grau de limitació al flux, expressat com a percentatge del Volum Tidal en posició supina, i els índex de dessaturacions i l'AHI (Verin 2002).

Els efectes de la hiperinflació sobre els MMRR s'han estudiat sobretot en el diafragma i en models animals. Hi ha, però, treballs publicats en humans i sobre altres MMRR (Clanton 2009). Els MMRR pateixen un actiu remodelatge a nivell cel.lular que sol manifestar-se com una milloria en la seva resistència i un increment en la seva capacitat oxidativa. En situació d'hiperinflació el diafragma presenta un escurçament que fa que es contragui amb menys força (lleï de Frank-Starling) degut a que la longitud del múscul no és òptima per a realitzar una contracció prou eficaç. A nivell subcel.lular això es tradueix en uns canvis passius en la longitud del sarcòmer que fan que la interacció entre l'actina i la miosina no sigui màxima. Apart, hi ha altres mecanismes moleculars implicats.

A més dels canvis adaptatius de tipus bioquímic i mecànic en els MMRR, s'han descrit signes de lesió a nivell del diafragma i altres MMRR en situació d'hiperinflació/obstrucció al flux aeri. Complementàriament, la lesió muscular s'ha associat amb l'apoptosi i l'estrès oxidatiu.

Respecte als restants músculs podem resumir dient que tant els M. inspiratoris com els espiratoris sofreixen una sèrie d'adaptacions en els pacients amb MPOC i hiperinflació pulmonar, que poden anar en paral.lel amb els canvis produïts en el diafragma i que probablement contribueixen a millorar la resistència de la bomba respiratòria. Això no obstant, els canvis observats en els altres MMRR no són tant importants com els que es manifesten a nivell diafragmàtic (Clanton 2009).

Clàssicament s'han intentat descriure els diferents factors que podien explicar la HD a la MPOC, des d'un abordatge preferentment mecànic. Només darrerament s'han contemplat els possibles vincles entre la HD i la inflamació, que és considerada un

component clau dintre de la fisiopatologia de la MPOC (Agustí 2006). La HD sembla tenir efectes proinflamatoris a nivell pulmonar i sistèmic, coneixent-se que l'estirament de la cèl.lula és un potent estímul proinflamatori i havent-se objectivat l'alliberament de citocines com a resposta inflamatòria en casos de sobredistensió pulmonar. Però, recíprocament, també la inflamació pot contribuir a la patogènia de la HD. L'edema, que és un component fonamental de la inflamació, pot augmentar la resistència a la via aèria i aquesta pot afavorir la HD. Així mateix, la destrucció dels tabics alveolars (enfisema) s'ha associat a la inflamació crònica que pateixen els malalts amb MPOC. I una de les principals conseqüències de l'emfisema és la pèrdua de la capacitat de retracció elàstica pulmonar, que és un altre factor determinant perquè es produeixi HD.

És possible que, en el futur, tractant la HD amb fàrmacs broncodilatadors, poguem disminuir indirectament el component inflamatori de la MPOC i que, a l'inrevés, amb la utilització de medicaments antiinflamatoris la HD i les seves conseqüències puguin ser controlades, sobretot els símptomes i la intolerància a l'exercici (Agustí 2006).

XIV.4.2. Efectes de la CPAP sobre la força muscular.

Els efectes de la CPAP sobre la força muscular respiratòria i perifèrica són més pronunciats en el grup OS. Més concretament, en pacients amb OS, després de fer el tractament amb CPAP augmenta la PIM i la força muscular perifèrica (expressada en aquest cas per la força de la mà no dominant). La PEM i la força a la mà dominant també mostren una tendència a la milloria, però sense assolir significació estadística. Cal assenyalar aquí que la força de la mà no dominant es troba habitualment més afectada pel decondicionament general que, alhora, té repercussió en altres mecanismes de disfunció muscular, com ara la inflamació o l'estrès oxidatiu. Dit d'una altra manera, el decondicionament muscular sol associar-se a la pèrdua de massa muscular i a la pèrdua de força, i a nivell de les extremitats afecta més a la mà no dominant. La mà dominant, per contra, depèn molt d'activitats específiques com ara escriure o manipular objectes, pel que no és tan sensible alhora de reflectir la disminució general de les activitats de l'organisme. Com que, habitualment, les activitats quotidianes es mantenen fins fases molt avançades de les malalties, el costat

dominant mostrarà un menor efecte derivat del decondicionament, conservant un major grau de massa i de força muscular (Martínez-Llorens 2010).

En els malalts amb SAHS, malgrat els valors semblen augmentar després del tractament, no trobem una milloria significativa tan estesa pels diferents grups musculars. L'únic paràmetre que presenta una forta tendència a millorar és la PEM. Val a dir que, en els pacients amb SAHS en situació basal, els paràmetres que avaluen la força muscular, globalment considerats, són superiors als dels malalts amb OS.

En un estudi previ del nostre grup (Arán 1999, Félez 2002) vàrem estudiar la força i la resistència dels MMRR en pacients amb SAHS, així com l'efecte que tenia el tractament amb CPAP sobre aquests mateixos paràmetres. Després de mesurar la PIM, la pressió transdiafragmàtica màxima (Pdimax) i la pressió esofàgica màxima (Pesmax) vam trobar que els malalts amb SAHS tenien una força als seus MMRR similar als individus control, i que la CPAP no era capaç de modificar-la. En canvi, al mesurar el temps de tolerància (Tlim) i l'índex pressió-temps inspiratori (PTimax) vàrem veure que aquests indicadors de resistència muscular respiratòria eren inferiors als dels controls, i que la CPAP sí que corregia aquesta resistència disminuïda. Aquest va ser el primer treball on es va demostrar una disfunció a nivell de la resistència dels MMRR en pacients amb SAHS i un efecte beneficiós específic de la CPAP sobre aquests mateixos músculs.

En un estudi més recent (Barreiro 2007), el nostre equip d'investigació va estudiar l'estrès oxidatiu i nitrosatiu als M. intercostals externs i la resistència dels MMRR en pacients amb SAHS més greu, a més dels efectes de la CPAP sobre ambdues variables. En aquest cas, vam observar uns nivells d'estrès oxidatiu incrementats a nivell dels M. intercostals externs i una resistència muscular respiratòria disminuïda en els malalts amb SAHS respecte als individus controls. L'estrès oxidatiu s'associava amb la gravetat de la SAHS. El tractament durant sis mesos amb CPAP no va disminuir l'estrès oxidatiu ni va incrementar la resistència dels MMRR malgrat que van millorar els paràmetres del son i la hipòxia nocturna i que el compliment terapèutic va ser bó. Novament, es va demostrar una disfunció a nivell dels MMRR en pacients amb SAHS. Com s'ha apuntat anteriorment, el fet que en aquest segon estudi la CPAP no hagi estat capaç de millorar la resistència muscular respiratòria podria atribuir-se a la major gravetat dels pacients inclosos.

Més recentment, s'ha publicat un treball que també ha estudiat els efectes de la CPAP sobre l'estrès oxidatiu i nitrosatiu a la SAHS (Alonso-Fernández 2009). Val a dir que, en aquest cas, els paràmetres avaluats van permetre mesurar l'estrès oxidatiu a nivell sistèmic, i no a nivell dels MMRR com en l'estudi del nostre grup. Els autors van trobar que els pacients amb SAHS mostraven uns nivells d'estrès oxidatiu superiors als dels subjectes control, i que el tractament amb CPAP va normalitzar aquests nivells. Hauriem de comentar que els malalts amb SAHS estudiats per Alonso-Fernández *et al.* presentaven una SAHS més lleu que els nostres, i que el BMI també era inferior. No van avaluar la funció dels MMRR.

La força dels MMRR ha estat avaluada per Shepherd *et al.* en pacients amb SAHS, juntament amb la força dels M. dilatadors de la faringe (Shepherd 2006). El col.lapse repetitiu de la via aèria superior (VAS) durant el son és una característica de la SAHS. La tendència al col.lapse depèn de l'equilibri entre les forces dilatadores generades per l'activitat dels M. dilatadors de la faringe i les forces que tendeixen a ocluir la VAS, entre les que destaquen els M. inspiratoris, que creen una pressió negativa a la llum de la faringe que permet el flux de l'aire cap als pulmons. La força desenvolupada durant una protusió màxima de la llengua (PTL) ens informa de la força realitzada pel principal M. dilatador de la VAS, el M. genioglòs, així com de l'activitat d'altres M. propis de la llengua. D'altra banda, la PIM ens informarà de la màxima força generada pels M. inspiratoris. La ratio PTL/PIM és un índex senzill que ens proporciona informació sobre la força relativa que fan els M. dilatadors de la VAS i els M. inspiratoris. Els autors van trobar que la PTL era més gran en individus amb SAHS que en els controls, però que les diferències desapareixien quan es corregien per l'edat i el BMI. No hi va haver diferències quant a la PIM entre els individus amb SAHS i els que no ho eren. No van trobar cap associació entre la PTL i l'AHÍ, ni entre la PIM i l'AHÍ. En canvi, sí que hi havia una correlació directa entre la PTL i la PIM. Un quocient PTL/PIM molt elevat s'associava a una menor propensió a patir SAHS moderada o greu. Els autors conclouen que uns valors elevats en l'esmentada ratio (avaluada durant l'estat de vigília) semblen indicar una protecció en front del col.lapse de la VAS durant el son.

Curiosament, un estudi previ (Mezzanotte 1992) realitzat amb menys pacients va evidenciar uns valors de PIM inferiors en els pacients amb SAHS respecte a un grup control. Dades similars s'han trobat en un estudi més recent en el que es van avaluar malalts amb SAHS greu (Chien 2010). Aquestes troballes suggereixen que, en alguns

malalts amb SAHS, especialment en aquells amb un AHI major, podria haver un component de disfunció muscular inspiratòria, expressada en termes de força màxima, probablement vinculat als efectes sistèmics de la SAHS, que se sumaria a l'efecte local sobre els músculs de la VAS. Així, doncs, malgrat la disfunció dels M. inspiratoris, hi hauria un col.lapse de la VAS propiciat per l'alteració a nivell dels M. dilatadors de la faringe.

En aquest darrer estudi, Chien *et al.* van avaluar la força i la resistència a nivell dels M. inspiratoris (diafragma) i dels M. de les extremitats (extensors del genoll). Tanmateix, van aplicar un protocol per estudiar el grau de fatiga dels MMRR i dels M. perifèrics. Els pacients amb SAHS presentaven una menor força i una menor resistència, tant a nivell dels M. extensors del genoll com dels MMRR, que un grup control d'edat i BMI equiparables. Quant a la fatiga, només els M. inspiratoris dels pacients amb SAHS van mostrar una major fatigabilitat (Chien 2010). Aquest treball suggereix que, en pacients amb SAHS greu, els esforços inspiratoris repetits al llarg de la nit junt amb l'efecte de la hipòxia intermitent, influeixen de manera negativa sobre la funció muscular respiratòria d'aquests malalts. En aquest cas, el component lesiu semblaria predominar sobre un hipotètic efecte d'entrenament de les contraccions musculars succesives. Aquest seria un element diferencial del que succeeix a la MPOC, on, com ja s'ha comentat, l'efecte entrenament tindria més pes en els MMRR.

Els efectes de la CPAP sobre la musculatura de la VAS semblen ben definits. El M. genioglòs que, com ja hem comentat, és el principal M. dilatador de la VAS, presenta alteracions estructurals i funcionals en els pacients amb SAHS. Més concretament, el M. genioglòs presenta una fatigabilitat augmentada en els malalts amb SAHS i, a més a més, mostra un percentatge augmentat de fibres tipus II respecte als individus control. Tant la fatigabilitat com els canvis en el fenotip fibril·lar són revertits pel tractament amb CPAP (Carrera 1999).

Podem concloure, doncs, que la força muscular millora globalment en els pacients amb OS després de ser tractats amb CPAP. Els mecanismes implicats podrien ser novament l'efecte beneficiós de la CPAP sobre el treball dels MMRR, que fa que siguin més resistents a la fatiga i que millori el seu rendiment. A més, no podem oblidar la influència de la CPAP sobre els paràmetres del son. Una correcció de

l'arquitectura del son, sense apnees ni dessaturacions nocturnes s'ha associat amb una milloria dels paràmetres cognitius i fisiològics. Alhora, cal considerar l'efecte beneficiós d'un bon repòs sobre tot l'organisme, i la seva repercussió positiva, ja sigui directa o indirectament, sobre la funció muscular perifèrica. Per acabar, una millora de la força muscular respiratòria pot influir positivament en les proves de funció respiratòria. El substracte molecular de tots aquests canvis podria ser l'efecte antiinflamatori de la CPAP a nivell sistèmic i sobre la musculatura respiratòria, ja abans esmentat. Respecte a la SAHS, els efectes són més discrets, amb una tendència aïllada a la milloria de la força muscular espiratòria. És probable que els elements diferencials entre la MPOC i la SAHS puguin explicar les diferents respostes que presenten els pacients amb la segona entitat i els malalts amb OS.

XIV.4.3. Efectes de la CPAP sobre l'estructura del son.

Els efectes de la CPAP sobre els paràmetres del son no mereixen gaires comentaris addicionals, doncs han estat molt previsibles: han millorat tots els paràmetres avaluats, tant en el grup SAHS com en l'OS.

XIV.4.4. Efectes de la CPAP sobre la morfometria muscular.

En el present treball, en els pacients amb SAHS el tractament amb CPAP se segueix d'una disminució en la proporció de fibres de tipus I en el M. intercostal extern. Així mateix, l'espai ocupat per aquestes fibres de tipus I també té tendència a disminuir després de 6 mesos de tractament. Recordem que aquest darrer grup, en situacions basals, mostrava una tendència a presentar un major percentatge d'aquestes fibres que no pas els subjectes sans. De fet, les fibres de tipus I eren les predominants en els malalts amb SAHS, cosa que no succeïa en els individus sans. Però, basalment, els pacients amb SAHS no només tenien una proporció de fibres de tipus I (oxidatives) amb tendència a estar augmentada, sinó que el tamany d'aquestes fibres i l'espai ocupat per les mateixes eren significativament més grans que els controls sans.

La nostra interpretació d'aquests resultats és que la tendència al remodelatge cap a un fenotip muscular més resistent deixa de produir-se a l'evitar els esforços inspiratoris intermitents derivats de les apnees nocturnes, que de fet emulaven un entrenament muscular. En aquest sentit el fenomen inicial seria similar al que es veu en pacients amb MPOC, encara que modulats per les característiques de l'esforç i les pròpies malalties.

Semblaria, doncs, que en els M. intercostals externs, especialment en els malalts amb SAHS, la CPAP produiria un cert efecte de decondicionament, com ho manifesta la ja repetida disminució del tant per cent de fibres de tipus I. Això es veuria reforçat per la tendència paral·lela que presenta l'espai ocupat per les mateixes fibres a disminuir després del tractament amb CPAP.

Inicialment podria sorprendre que la "involució anaeròbica" provocada per la CPAP no s'observi en els pacients amb OS. És cert, però, que en el nostre estudi la gravetat de la malaltia avaluada per l'AHI en els malalts amb SAHS és superior a la dels subjectes amb OS. Això no obstant, és possible que aquest descens en el percentatge de fibres de contracció lenta sigui menys pronunciat en els pacients amb OS degut a que en ells persistiria l'augment continuat (no intermitent) de les càrregues respiratòries derivat de la MPOC.

XIV.4.5. Efectes de la CPAP sobre l'expressió gènica de les cadenes pesants de miosina.

No s'han trobat diferències pre i post-CPAP en els pacients amb SAHS. Per contra, els malalts amb OS presenten una tendència a una expressió disminuïda de MyHC-I en el seu M. Intercostal després de ser tractats amb CPAP. Podriem aplicar la mateixa reflexió que hem fet al comentar els canvis produïts per la CPAP en la morfometria muscular, encara que en aquest cas no s'ha arribat a expressar en canvis en el fenotip fibril·lar.

XIV.4.6. Efectes de la CPAP sobre els mediadors de la inflamació.

En el present treball, després d'aplicar el tractament amb CPAP, en els malalts amb SAHS hem trobat una disminució en una de les citocines analitzades a nivell dels M. intercostals, la IL-6, que té propietats proinflamatòries ben conegudes. D'altra banda, l'única interleucina antiinflamatòria avaluada, la IL-10, presenta un augment de la seva expressió a nivell dels M. intercostals després del tractament amb CPAP.

Els estudis realitzats fins ara sobre els efectes de la CPAP sobre els mediadors inflamatoris havien avaluat aquets darrers en sang perifèrica. Que nosaltres sapiguem, el nostre grup és l'únic que ha estudiat diferents marcadors de la inflamació a nivell local i, més concretament, a nivell dels MMRR. En un estudi ja citat en la present tesi doctoral (Barreiro 2007), el tractament amb CPAP durant 6 mesos va millorar els paràmetres del son, l'oxigenació nocturna i la funció pulmonar de pacients amb SAHS greu. Això no obstant, la resistència dels MMRR i diferents paràmetres d'estrès oxidatiu avaluats a nivell dels M. intercostals no van millorar amb el tractament amb CPAP.

D'acord amb les dades presentades en aquesta tesi, hom podria inferir que la CPAP té un efecte antiinflamatori local (muscular) en pacients amb SAHS, que es manifesta en el descens en l'expressió de la principal citocina proinflamatòria de producció muscular, la IL-6, i l'augment de la IL-10 a nivell dels M. intercostals.

Probablement, els mecanismes per explicar l'efecte del tractament amb CPAP siguin multifactorials. Hom sap que la hipòxia és capaç d'induir un augment en els nivells de IL-6 en humans, i que el tractament amb CPAP corregeix les dessaturacions nocturnes que es produeixen a la SAHS.

Ja hem comentat més amunt com la producció de IL-6 a nivell muscular augmentava durant l'exercici, i que els nivells assolits en sang depenien de la intensitat i la duració del treball realitzat, així com de la massa muscular del múscul implicat. El tractament amb les diferents modalitats de ventilació no invasiva (inclosa la CPAP) ha demostrat disminuir el treball respiratori en els pacients amb insuficiència respiratòria. Resulta atractiu pensar que, en malalts amb SAHS, el tractament amb CPAP al reduir les càrregues ventilatòries pogués associar-se a una disminució en la producció local de IL-6.

Tanmateix, la fragmentació del son o la seva deprivació també indueixen un increment en els nivells plasmàtics de citocines. De tots són conegudes les alteracions en la arquitectura del son presents a la SAHS, i com la CPAP és capaç de revertir aquestes alteracions. Com ja vàrem mencionar en l'apartat de resultats, en els nostres pacients la CPAP va normalitzar la totalitat dels paràmetres del son avaluats, la qual cosa podria contribuir a explicar el descens en l'expressió de IL-6 a nivell del M. intercostal observat després del tractament.

Hi ha una clara relació entre la producció de IL-6 i l'adipositat. En la població estudiada no hem trobat una disminució significativa de pes, mesura que forma part de les recomanacions i del tractament integral de la SAHS. Així, doncs, no podem atribuir el canvis observats en l'expressió de citocines a canvis derivats en la producció d'aquestes molècules a nivell del teixit adipós.

Un altre estímul per a la producció de IL-6 és la inflamació sistèmica. En el grup de pacients analitzat tampoc ens consten infeccions i/o malalties inflamatòries concomitants que puguin afectar la síntesi de citocines. Per tant, i d'acord amb estudis previs, podríem assumir que els pacients amb SAHS presenten una activació dels processos inflamatoris en forma d'inflamació de baix grau, que es podrien revertir amb un tractament adequat amb CPAP. És possible que si aconseguíssim tractar correctament l'obesitat que coexisteix en una gran part dels malalts amb SAHS, els

mediadors de la inflamació disminuïssin més encara. Potser això podria explicar un descens del risc cardiovascular en els malalts tractats correctament.

Altres autors han descrit les propietats antiinflamatòries de la CPAP en pacients amb SAHS. Ja era conegut un efecte agut, durant la primera nit de CPAP, sobre l'estat immunitari dels pacients amb SAHS (Nakamura 2001). Aquest autor va trobar un descens en el recompte de limfòcits CD4+ en sang durant la primera nit de tractament. En un altre capítol havíem comentat com la CPAP semblava disminuir les concentracions sèriques d'algunes citocines proinflamatòries en diversos treballs publicats prèviament (Yokoe 2003, Ryan 2005, Steiropoulos 2007). Més recentment, s'ha objectivat una disminució en el nombre total de limfòcits CD4+ en sang en els pacients que feien un bon compliment de la CPAP durant 6 mesos. Paral·lelament, en aquest mateix subgrup de pacients ben tractats, els nivells sèrics de TNF havien disminuït (Steiropoulos 2009). Això no passava amb la IL-6 sanguínia, que no es va modificar amb el tractament, la qual cosa pot significar que hi hauria una diferència entre l'expressió local de IL-6 a nivell dels MMRR i els nivells circulants d'aquesta citocina. Potser en el primer cas traduiria estrictament una síntesi de IL-6 a partir de la fibra muscular i, en el segon, ens trobaríem també amb la producció sistèmica de IL-6 a partir dels macròfags i dels limfòcits activats.

Tanmateix, havent-se demostrat els efectes beneficiosos de la CPAP i la seva capacitat per a reduir les malalties i els factors de risc cardiovascular, s'han avaluat els nous dispositius de pressió positiva automàtica a la via aèria (APAP) i la seva repercussió sobre la IL-6 i la PCR (Drummond 2009). Aquests dispositius s'han introduït com una teràpia alternativa a la CPAP clàssica, i s'ha vist que poden millorar els símptomes i el compliment del tractament, alhora que es redueixen els costos que suposa el fet d'ajustar la dosi de CPAP. Després de confirmar que els nivells sèrics de PCR es trobaven augmentats respecte a un grup control, els autors van aplicar la APAP a 98 pacients amb SAHS, i no van trobar cap disminució significativa dels valors de PCR ni de IL-6 ni a curt ni a llarg termini (6 mesos).

Fóra interessant saber perquè les altres citocines proinflamatòries que hem estudiat no presenten canvis significatius. Tractant-se de mediadors de la inflamació, que poden sintetitzar-se i trobar-se a múltiples localitzacions, els mecanismes implicats seran complexos i multifactorials. Però, una possible explicació vindria donada per la

important vinculació que existeix entre la producció de IL-6 i la seva síntesi i secreció a nivell muscular, és a dir, entre la síntesi al propi múscul i els nivells detectats d'aquesta citocina. Probablement, la IL-1 és produïda per moltes altres cèl·lules i el pes de la seva presència a nivell muscular sigui menor.

També crida l'atenció el fet que no hem trobat un efecte antiinflamatori rellevant de la CPAP en els pacients amb OS. Probablement, els beneficis de la CPAP serien més específics en el component de SAHS que presenten aquests malalts. El fet de tenir dues malalties alhora podria modificar els efectes de la ventilació no invasiva a nivell local, ja que persistirien els mecanismes d'activació de la síntesi de citocines locals derivats de la MPOC. Fins avui, no hi han treballs que avaluïn els efectes de les diverses modalitats de suport ventilatori sobre la inflamació muscular en pacients amb MPOC.

XIV.5. DISCUSSIÓ SOBRE LES ASSOCIACIONS ENTRE VARIABLES. CORRELACIONS.

XIV.5.1. Grup Obesitat.

En el present estudi hem considerat el grup d'individus obesos sense comorbilitats associades com un dels controls respecte als malalts també obesos però que presentaven SAHS o OS. Malgrat tot, som conscients que l'obesitat és una entitat nosològica "per se", que s'acompanya d'alteracions estructurals i funcionals a diferents òrgans.

En primer lloc cal assenyalar que, com era d'esperar, en els subjectes obesos hem trobat una associació directa entre el BMI i el FEV₁/FVC. Múltiples estudis han demostrat que l'obesitat s'acompanya d'una reducció en els volums pulmonars.

A més a més, els pacients que patien exclusivament d'obesitat presentaven una associació entre el seu pes i el percentatge de fibres de tipus II a nivell del M. intercostal extern. Tal i com hem comentat en l'apartat d'Introducció, es ben conegut que els pacients obesos presenten un major percentatge de fibres de tipus II a nivell dels seus músculs perifèrics. La relació entre el pes i la proporció de fibres de tipus II observada en el nostre treball semblaria corroborar la importància de les fibres anaeròbiques en el M. intercostal dels pacients més obesos. El nostre grup ha estat el primer en descriure la morfometria d'un M. respiratori en subjectes obesos.

També cal destacar que, en els pacients amb obesitat, l'expressió de les cadenes pesants de miosina d'un dels subtipus de fibres de contracció ràpida, les de tipus IIa (MyHC-IIa), es relacionava amb l'expressió de citocines amb propietats pro- i antiinflamatòries. Més concretament, presentava una correlació directa amb l'expressió de TNF i una relació inversa amb l'expressió de IL-10. Així, doncs, sembla ser que quanta més inflamació existeix a nivell del M. intercostal, més important és l'expressió de miosina de les fibres de tipus II que, com s'ha dit adalt, són les predominants en l'obesitat. A l'inrevés, quan predomina l'expressió de citocines antiinflamatòries (IL-10) hi ha una menor expressió de MyHC-IIa. Encara que el disseny del nostre treball no ho permet confirmar, i que no era un dels nostres objectius, podria existir una relació

causal entre la inflamació local i el fenotip muscular a l'obesitat. Futurs estudis podrien analitzar aquesta hipòtesi.

Tanmateix, hem observat una relació inversa entre la saturació nocturna d'oxigen i la inflamació, tant a nivell subcel·lular (expressió de TNF) com cel·lular (nombre de leucòcits). En altres paraules, quanta més tendència a la hipòxia nocturna, més inflamació hi ha a nivell del M. intercostal dels subjectes obesos. Això podria implicar que elements d'hipoventilació podrien jugar un paper en la gènesi de la inflamació a nivell dels MMRR en l'obesitat.

XIV.5.2. Grup MPOC.

El grau d'obstrucció a la via aèria (FEV_1) dels malalts amb MPOC presenta una relació inversa amb la proporció de fibres de tipus I, de metabolisme predominantment oxidatiu, al M. intercostal extern. Sembla ser, doncs, que quant més gran és el compromís de la malaltia respiratòria, més fibres resistents a la fatiga hi ha en el M. intercostal. Més encara, en un estudi recent del nostre grup (Casadevall 2007) amb una sèrie més llarga de pacients amb MPOC, l'empitjorament de la funció muscular respiratòria també s'associava amb el nivell d'obstrucció a la via aèria mesurat pel FEV_1 . Seria coherent pensar que, en malalts amb MPOC, hi ha una relació entre la malaltia a la via aèria, la disfunció muscular, i el substrate anatòmic muscular a nivell dels MMRR. L'adaptació aeròbica que mostren els intercostals en el present estudi concorda perfectament amb estudis anteriors que mostren resultats similars, tant als intercostals com al diafragma (Levine 2003).

Per contra, en un altre treball del nostre grup (Barreiro 2008) es va estudiar el M. quàdriceps d'individus amb MPOC greu i es va evidenciar una disminució en la proporció de les fibres de tipus I i de la força muscular en comparació amb el grup control. Aquestes dades són consistents amb la literatura especialitzada (Gosselink 1996, Gosker 2003). En altres pàgines de la present tesi ja s'ha comentat com en els pacients amb MPOC també hi havia una disfunció muscular perifèrica. Entre els diferents mecanismes implicats hi ha el menor nombre de fibres musculars resistents a

la fatiga, però també sembla jugar un paper important la inflamació local i sistèmica observada a la MPOC.

D'altra banda, en el present estudi, els pacients amb MPOC que presenten un major grau d'emfisema pulmonar, avaluat mitjançant el quocient DLco/VA (també anomenat Kco), tenen més cèl.lules inflamatòries, i més concretament, més leucòcits per unitat de superfície, a nivell del teixit muscular intercostal. Això últim podria suggerir que una reacció inflamatòria amb expressió local, fins i tot en les seves fases inicials, podria estar present de forma específica en els malalts amb emfisema, i participar en el deteriorament clínic d'aquests pacients. Que nosaltres sapiguem, és la primera vegada que es descriu un component inflamatori cel.lular a nivell del M. intercostal extern dels pacients amb MPOC, sobretot de fenotip enfisematós, tot i que, cal insistir, no es tracta d'un infiltrat inflamatori com l'observat en altres malalties primàries del múscul, com podrien ser les miopaties inflamatòries o infeccioses.

Tanmateix, altres estudis han avaluat el component inflamatori a nivell molecular en els músculs de pacients amb MPOC. En el treball previ abans esmentat del nostre grup (Casadevall 2007) es va descriure un augment de les concentracions locals de determinades citocines proinflamatòries en el M. intercostal extern. Les nostres troballes actuals, amb la presència de leucòcits a nivell muscular, vindrien a corroborar la presència d'elements implicats en la inflamació local a nivell del M. intercostal. A més a més, semblen indicar que les citocines locals podrien originar-se no solament en les fibres musculars sinò també en les cèl.lules inflamatòries presents en el teixit muscular. Més controvertida seria la interpretació d'aquestes troballes, doncs recentment (Casadevall 2009) s'ha suggerit que algunes de les citocines expressades a nivell local podrien participar en els mecanismes de reparació dels MMRR, i no tant en els de lesió muscular.

XIV.5.3. Grup SAHS.

XIV.5.3.1. Correlacions basals.

La primera associació que cal comentar és la que hi ha entre la força dels MMRR inspiratoris, avaluada mitjançant la PIM, i l'expressió de les cadenes pesants de miosina més ràpides, les de les fibres IIX (MyHC-IIx). Com ja hem descrit en altres capítols del present treball això seria coherent, doncs la isoforma MyHC-IIx (constituent de les fibres musculars de tipus II) seria l'específica per a realitzar un treball que requereixi una força intensa i de curta durada. La PIM és mesurada mitjançant una maniobra d'aquestes característiques, la qual cosa justifica la relació directa que hem trobat amb l'expressió gènica de les fibres de contracció ràpida.

Hem trobat una correlació directa interessant entre la proporció de fibres de tipus I i dos paràmetres relacionats amb la inflamació, l'expressió de IL-6 i la del receptor 2 del TNF (TNFr2). En el primer apartat dedicat a la discussió veiem com els pacients amb SAHS presentaven un predomini de fibres de contracció lenta, més resistents a la fatiga en el seu M. intercostal extern. Especulàvem sobre la possibilitat que aquest múscul respiratori, treballant més i en condicions subòptimes s'hagués adaptat i presentés un fenotip ideal per a mantenir un treball respiratori prolongat en el temps (capacitat de resistència augmentada). D'altra banda hem revisat com la IL-6 podia ser considerada una verdadera *miocina*, donada la seva important participació a nivell muscular. La vinculació entre les fibres de tipus I i una certa reacció inflamatòria mediada, entre d'altres, per la IL-6, podria indicar que en malalts amb SAHS, a nivell del seu M. intercostal, la IL-6 podria tenir un paper més vinculat a la reparació que no pas a la lesió muscular. En l'article repetidament citat del nostre grup (Casadevall 2009), realitzat en pacients amb MPOC greu, ja observàvem una estreta relació entre l'expressió dels receptors de TNF i l'activació de la miogènesi, la qual cosa suggeria que algunes citocines locals participaven en la reparació dels MMRR en pacients amb MPOC. En resultats preliminars molt recents, cultius de miòcits procedents de pacients amb MPOC semblen diferenciar-se tan sols si hi ha una bona operativitat dels receptors de TNF (Pascual 2011). Les dades adalt presentades semblen reforçar la hipòtesi que a la SAHS hi hagi un efecte similar.

De la mateixa manera, mereix ser comentada la relació directa entre els nivells d'expressió dels gens de IL-1 i IL-6, i també del receptor 1 del TNF (TNFr1) i el nombre de macròfags presents al M. intercostal. És coherent que existeixi una associació entre els components cel·lular i subcel·lular de la inflamació. A més, és ben coneguda la vinculació entre els macròfags i la producció de TNF. Així doncs, no és d'estranyar que l'expressió del receptor d'aquesta citocina es trobi relacionada amb la principal cèl·lula que la produeix. Potser es podria inferir un protagonisme de les cèl·lules inflamatòries en l'origen de les citocines trobades en el M. intercostal dels pacients amb SAHS. Dit d'una altra manera, la principal font de citocines proinflamatòries serien les cèl·lules inflamatòries, i no tant les fibres musculars o endotelials, la qual cosa justificaria la presència augmentada de leucòcits a nivell muscular. Naturalment, aquesta afirmació hauria de ser confirmada per altres estudis, especialment dissenyats per a descobrir quina és la cèl·lula concreta que produeix una determinada citocina en el teixit muscular.

XIV.5.3.2. Efecte de la CPAP.

Pel que fa a la funció respiratòria dels pacients amb SAHS que han rebut tractament amb CPAP, comentarem en primer lloc les associacions en els canvis observats en l'oxigenació.

Els canvis produïts per la CPAP respecte a l'oxigenació han estat bàsicament una millora en la PaO_2 , que s'ha relacionat inversament tant amb els canvis produïts en la FRC com amb els del quocient RV/TLC. Es ben sabut que els pacients obesos i alguns pacients amb SAHS presenten una marcada reducció en la FRC, i que la CPAP l'augmenta. L'aplicació de pressió positiva a la via aèria incrementa la FRC amb el reclutament addicional de segments pulmonars que fan que millori la ventilació i la relació ventilació/perfusió (V/Q), la qual cosa augmenta l'oxigenació. També altres paràmetres d'atrapament aeri podrien millorar amb la CPAP, la qual cosa podria explicar les associacions que hem trobat entre la PaO_2 i el quocient RV/TLC. Apart del seu efecte sobre els volums pulmonars, no hem d'oblidar l'efecte de la CPAP sobre la via aèria superior (evitant el col·lapse de la mateixa i permetent l'oxigenació correcta durant la nit), sobre els MMRR (prevenint la seva fatiga) i sobre els paràmetres del son (son reparador amb una arquitectura preservada).

Pel que fa a l'estudi del son, la gravetat de la malaltia avaluada per l'AHI, mesurada abans del tractament, s'ha associat amb els canvis provocats per la CPAP en la proporció de fibres de tipus I i en l'expressió de TNF. Els pacients que presentaven més apnees i hipopnees són els que han mostrat una major reducció en les fibres de contracció lenta, més resistents a la fatiga. Novament, sembla que aquestes fibres hagin estat el resultat d'un mecanisme adaptatiu a un major treball respiratori, quan els pacients amb SAHS encara no han estat tractats. La CPAP, amb el seu efecte de reduir el treball dels MMRR i, més concretament, del M. intercostal extern, provocaria un desplaçament en el fenotip muscular cap a l'increment en la proporció de fibres de contracció ràpida.

La relació entre l'AHI i els canvis en els nivells d'expressió de TNF a nivell del M. intercostal, podria indicar una participació important del component inflamatori en la malaltia que es veuria modificat a nivell local per la intervenció terapèutica. Seguint en aquesta línia es trobaria la correlació negativa que hem observat entre l'expressió de TNF a nivell del M. intercostal i els canvis en la saturació mitjana d'O₂ durant la nit observats després del tractament amb CPAP. Els pacients amb SAHS que presentaven un nivells més alts de TNF al múscul són els que mostren una millora més petita en la saturació nocturna amb la CPAP. Donat que nombrosos estudis han demostrat un efecte antiinflamatori de la CPAP, aquesta darrera troballa s'hauria d'interpretar com que aquells pacients amb més inflamació local, mesurada per l'expressió de TNF a nivell muscular, serien més greus i, per tant, més difícils de tractar i amb una resposta al tractament més discreta. La relació abans esmentada entre l'AHI i el TNF sembla donar suport a aquesta interpretació.

Tanmateix, el vincle entre CPAP i inflamació, o millor dit, el seu efecte antiinflamatori, sembla aparèixer de nou quan observem la relació que hi ha entre el temps que els pacients utilitzen la CPAP durant la nit i els canvis provocats en l'expressió de IL-6. Aquells malalts amb SAHS que fan més ús de la CPAP són els que aconseguen un descens més important dels nivells de IL-6 a nivell muscular. En altres paraules, a més CPAP, major reducció en la inflamació local, mesurada per una interleucina proinflamatòria tan important pel múscul com és la IL-6.

Els canvis induïts per la CPAP sobre la morfometria del M. intercostal semblen focalitzats a les fibres de tipus I. Així ho indica el fet que hi hagi associacions en les modificacions provocades per la CPAP a nivell de l'expressió gènica de les cadenes pesants i els tamanyos cel·lulars. La CPAP tindria una acció sobre tots els paràmetres avaluats a les fibres musculars. Hem vist com provocava canvis en els percentatges fibril·lars, en el tamany de les fibres i en l'expressió gènica de les cadenes pesants. Si bé es cert que alguns d'aquests canvis no assolien una significació estadística, el fet que hi hagi una clara tendència al canvi i que les correlacions entre variables de morfometria hi siguin presents, suggereixen un impacte no despreciable del tractament amb CPAP sobre totes aquestes variables. Potser amb una mostra més gran de població podríem confirmar que hi ha un substracte anatòmic a nivell del M. intercostal que contribueix a les nombroses millores que la major part d'estudis han documentat en els paràmetres fisiològics musculars i en la clínica relacionada dels pacients amb SAHS després de ser tractats amb CPAP.

Finalment, voldríem comentar dos aspectes més de l'efecte de la CPAP sobre el component inflamatori a nivell del M. intercostal extern. En primer lloc, els canvis observats en l'expressió dels dos receptors de TNF presenten una relació lineal entre ells. En segon lloc, i per acabar, hem trobat una correlació directa entre el nombre de macròfags musculars i els canvis en l'expressió d'una citocina proinflamatòria, la IL-6. La relació és inversa amb la citocina antiinflamatòria que hem estudiat, la IL-10. Més detalladament, els pacients amb SAHS que tenien més macròfags a nivell muscular, són els que tenien un canvi més marcat a nivell d'aquestes dues interleucines. En aquest sentit, cal recordar que la CPAP induïa un descens en els nivells d'expressió de la IL-6 i pujava els de la IL-10. Tot això indicaria un efecte antiinflamatori local de la CPAP que, a més, seria més pronunciat en aquells malalts amb un major component inflamatori inicial.

XIV.5.4. Grup *Overlap*.

XIV.5.4.1. Correlacions basals.

En el grup de pacients amb OS, el grau d'atrapament aeri, expressat pel RV o el RV/TLC, ha presentat associacions amb el grau d'hipoxèmia, els nivells d'expressió gènica de certes citocines proinflamàtores i la intensitat de la somnolència. Més concretament, els pacients que tenien un major atrapament aeri, eren els que presentaven més hipoxèmia tant de dia (PaO_2) com de nit (saturació mitjana d'oxigen durant la nit). Aquesta dada sembla indicar que dins de l'OS, que participa de dues entitats com són la SAHS i la MPOC, els pacients amb més afectació de la malaltia pulmonar presenten un major grau d'hipoxèmia. També hi ha una correlació directa entre l'atrapament aeri i els nivells d'expressió de TNF a nivell del M. intercostal. En un altre apartat de la present tesi ja hem comentat els vincles existents entre la hiperinsuflació pulmonar i la inflamació, però no està de més recordar alguns conceptes que poden il·lustrar la associació entre els paràmetres de funció pulmonar i la resposta inflamatòria.

Es parla d'hiperinsuflació dinàmica (HD) quan hi ha un increment del volum pulmonar al final de l'expiració que succeeix en pacients amb limitació al flux aeri quan la ventilació minut augmenta, com sol passar en situacions d'exercici, hipòxia o ansietat. La HD sol presentar-se en malalts amb MPOC moderada o greu i, com ja hem mencionat anteriorment, és un dels principals responsables dels símptomes i de la baixa tolerància a l'exercici que presenten aquests pacients. Poc se sap de la HD en individus amb OS. En els pacients amb MPOC hi ha diferents mecanismes pels quals la HD pot induir una resposta inflamatòria i, a l'inrevés, la pròpia inflamació pot contribuir al desenvolupament de la HD (Agustí 2006). Un dels principals mecanismes pels que la HD pot provocar inflamació és l'estirament cel·lular. Com ja hem explicat en seccions anteriors, les forces que tendeixen a allargar les cèl·lules suposen un potent estímul proinflamatori. Tant en cultius cel·lulars com en estudis sobre ventilació mecànica s'ha vist que l'estirament cel·lular o la sobredistensió pulmonar, respectivament, indueixen una resposta inflamatòria amb l'augment de la producció local i sistèmica de citocines (Agustí 2006). Més concretament, s'ha documentat un increment de la IL-1 i del TNF, així com dels seus receptors, i també dels nivells de IL-6 i IL-8 (aquesta darrera *in vitro*) (Ranieri 1999, Vlahakis 1999).

Sense que es puguin establir aquí relacions de causa-efecte, és coherent pensar que les associacions entre l'afectació dels volums pulmonars i la hipoxèmia que hem observat en els individus amb OS puguin tenir un substracte comú en el component inflamatori que, en aquest cas, hem observat com un augment en l'expressió local de TNF.

Per últim, el grau d'hipersòmnia, mesurat per la ESS, també s'ha trobat associat amb l'atrapament aeri (en aquest cas la relació és inversa) i aquest darrer –com hem vist– amb l'expressió local de citocines. Darrerament s'han descrit els possibles efectes de les citocines proinflamatòries sobre el son (Brambilla 2010, Gozal 2010). L'administració de citocines, com la IL-1 i el TNF, a animals d'experimentació suprimeix el son REM. Avui dia existeix una àmplia evidència que la IL-1 i els seus receptors i antagonistes s'expressen normalment en el cervell, i que modula el son i certs comportaments. Els efectes de la IL-1 sobre les fases noREM del son són dosidependents: a dosi baixes augmenta el son noREM, mentre que a dosi altes l'inhibeix. Així mateix, la IL-1 suprimeix el son REM en diferents espècies d'animals, i ho fa a dosi molt diverses (Brambilla 2010).

D'altra banda, el TNF és una de les citocines més importants vinculades a la regulació del son i ha estat relacionat amb la somnolència diürna. La injecció de TNF indueix un son fisiològic i augmenta el temps de son noREM durant la nit. Els nivells de TNF segueixen un ritme circadià i s'incrementen després de la privació de son. La inhibició dels receptors de TNF al cervell s'acompanya de la supressió del son noREM espontani. Ja hem comentat que els nivells de TNF es trobaven augmentats en els pacients adults amb SAHS. De fet, els nivells circulants de TNF s'han proposat com a marcador biològic de la excessiva somnolència diürna. Fa anys es va demostrar que la neutralització de l'activitat del TNF mitjançant l'administració d'etanercept s'associava a una disminució de la hipersòmnia diürna en pacients adults amb SAHS (Vgontzas 2004). Recentment, en un estudi realitzat en nens (Gozal 2010), es va descriure que els nivells de TNF al plasma es trobaven elevats a la SAHS pediàtrica i estaven primàriament relacionats amb la fragmentació del son i amb el BMI i, a més a més, estaven estretament associats amb el nivell de somnolència mesurat pel Test de Latències Múltiples de Son (MSLT). Més encara, el tractament quirúrgic de la SAHS en aquests nens (amigdalectomia) provocava una disminució en els nivells de TNF i una prolongació recíproca dels temps de latència del son.

Però, tornant al nostre treball i d'acord amb els coneixements previs sobre les apnees del son, sembla força evident que la hipersòmnia diürna és el resultat de la malaltia de la via aèria superior i de les alteracions en l'arquitectura del son (component SAHS de l'OS) que pateixen aquests pacients. Potser això explicaria la manca de correlació directa entre la somnolència i l'atrapament aeri en els malalts amb OS inclosos en aquesta tesi doctoral.

Per acabar amb les associacions que presenten els paràmetres de funció pulmonar amb altres variables analitzades en el grup OS, comentarem la correlació positiva que hem trobat entre el grau d'emfisema, mesurat mitjançant el quocient DLCO/VA i el tamany de les fibres musculars, tant pel que fa a l'àrea de les fibres de tipus I com a la de les fibres de tipus II. Com més gran és el quocient, més grans són les fibres. La conseqüència d'aquest fet podria trobar-se en que els malalts més greus (amb pitjor DLCO/VA) i amb més que probable hipoxèmia tindrien unes fibres musculars més petites, fet que contribuiria a la seva limitació a l'exercici. Això es donaria en estadis avançats, un cop ultrapassats els mecanismes compensatoris inicials de remodelatge muscular. Una altra possibilitat fóra que existís un component de decondicionament muscular general, derivat de l'alteració pulmonar.

Pel que fa a la inflamació, s'ha trobat una correlació negativa entre el nombre de leucòcits i de macròfags presents al teixit muscular i el tamany de les fibres. Seguint la línia d'argumentació del paràgraf anterior, un menor tamany de les fibres a nivell dels MMRR semblaria perjudicial per a la funció pulmonar. El fet que les fibres més petites presentin una major resposta inflamatòria cel·lular associada, podria indicar que la presència de leucòcits i, tal vegada, els seus mediadors, estaria implicada en els mecanismes de lesió tisular al múscul. D'altra banda, hi ha associacions directes entre les diferents citocines proinflamatòries, destacant l'existent entre la IL-1 i la IL-6.

XIV.5.4.2. Efecte de la CPAP.

En els malalts amb OS, després del tractament amb CPAP, trobem una associació directa entre els canvis produïts en l'expressió gènica de les cadenes pesants de miosina de contracció ràpida (MyHC-IIx) i els canvis observats en la força dels músculs inspiratoris (PIM). No cal insistir en les propietats idònies per al desenvolupament de treballs de força d'aquesta varietat de miosina, que condiciona les propietats funcionals de les fibres musculars. En el grup de pacients amb SAHS havíem trobat la mateixa correlació tant en situació basal, com després del tractament amb CPAP. A més a més, com es recordarà, també existia una correlació amb el tamany de les fibres de tipus II. En els dos grups de pacients amb trastorns respiratoris durant el son, i pel que fa a la força dels MMRR, sembla haver una vinculació entre els mecanismes moleculars i els cel.lulars amb les propietats funcionals (mesura de la força mitjançant la PIM). La CPAP podria actuar a tots aquets nivells, provocant canvis moleculars i estructurals que suposarien una millora funcional dels M. intercostals.

En els malalts amb OS, sembla corroborar-se la darrera afirmació en constatar que els canvis produïts en la grandària global de les fibres musculars del M. intercostal després del tractament amb CPAP, es correlacionen amb els canvis observats en la capacitat d'esforç dels individus, mesurada mitjançant la prova de la marxa durant sis minuts. Així, doncs, la CPAP podria actuar sobre la força muscular respiratòria i sobre la resistència global individual, millorant la capacitat d'exercici dels malalts amb OS. Això està en línia amb l'argument de l'apartat anterior, on suggeríem que la funció dels MMRR podia ser un factor que contribuís a la limitació a l'exercici en els pacients amb OS, de forma similar al que s'ha descrit en la MPOC.

Per acabar, ens assembla d'interès considerar les associacions observades en algunes variables de la inflamació després d'haver aplicat el tractament amb CPAP als pacients amb OS. En primer lloc, els canvis observats en l'expressió gènica de la principal interleucina muscular, la IL-6, presentaven una correlació directa amb els canvis observats en l'expressió gènica de les dues altres citocines proinflamatòries estudiades a nivell del M. intercostal, la IL-1 i el TNF. Això sembla indicar que els efectes de la CPAP sobre els mediadors de la inflamació local, són generals. Es podria hipotetitzar que aquests canvis inflamatoris a nivell subcel.lular serien el reflex de canvis adaptatius a nivell cel.lular, tant pel que fa al nombre de cèl.lules inflamatòries

com als fenòmens de remodelatge de la fibra muscular, tots ells promoguts per l'ús de la CPAP. No cal tornar a enumerar els nombrosos efectes beneficiosos d'aquest tractament sobre múltiples factors vinculats a la SAHS i, per extensió, a l'OS. Només volem remarcar els seus potencials efectes sobre els fenòmens inflamatoris que, en la present tesi, hem estudiat a nivell local (M. intercostal extern).

Finalment, després d'aplicar la CPAP als malalts amb OS, els canvis observats en l'expressió gènica del receptor 2 de TNF (TNFr2) presentaven una associació directa amb els produïts en l'expressió de les cadenes pesants de miosina, tant de tipus I com IIa (MyHC-I i MyHC-IIa). Semblaria, doncs, que els efectes de la CPAP sobre certs components de la inflamació a nivell muscular local afectarien tant a les fibres de contracció ràpida com a les de contracció lenta. Saber si els efectes dels mediadors inflamatoris tenen un component predominantment reparador en un tipus de fibres i més lesional en l'altre tipus de cèl.lules musculars és quelcom que no pot respondre el present treball. Però, ja hem vist com una mateixa citocina, depenent de la intensitat de la seva activitat i de l'entorn on es trobi, pot actuar de manera molt diferent, fins i tot, amb efectes aparentment contraris.

XIV.6. ADDENDUM A L'APARTAT DE DISCUSSIÓ. CONSIDERACIONS SOBRE L'ESTRÈS OXIDATIU, L'ÒXID NÍTRIC I LA LEPTINA.

L'estrès oxidatiu en els M. intercostals dels pacients amb MPOC i SAHS ja ha estat objecte d'estudi en altres treballs del nostre grup (Barreiro 2007). Les troballes de la present tesi únicament són complementàries d'aquests estudis precedents i s'inclouen com *addendum*.

Estrès oxidatiu i Òxid Nítric.

Podem resumir dient que els nivells d'expressió dels gens de l'hemoxygenasa-1 i de les tres isoformes de la sintetasa de l'òxid nítric eren superiors, o mostraven aquesta tendència, en els individus obesos que en els pacients amb trastorns respiratoris durant el son, ja foren SAHS o bé OS. Encara que, en aquest cas, no tenim analitzats controls sans, podríem deduir que el factor obesitat sembla tenir un pes molt superior als altres pel que fa a aquests marcadors. Són ben coneguts els vincles existents entre l'estrès oxidatiu, l'obesitat i les malalties associades. L'estrès oxidatiu juga un paper fonamental en la fisiopatologia de la diabetis, la hipertensió o l'aterosclerosi. De fet, es creu que l'estrès oxidatiu provocat per l'acúmulo de greix és el responsable, en part, del desenvolupament de la síndrome metabòlica, degut a les alteracions que provoca a nivell de les adipocines. Però hi ha autors que suggereixen que l'obesitat "per se" pot induir estrès oxidatiu a nivell sistèmic. Així semblen confirmar-ho estudis experimentals (Furukawa 2004) i epidemiològics (Keaney 2003).

En pacients amb SAHS, i referent als canvis provocats per la CPAP en l'expressió de TNF a nivell del M. intercostal, aquests presenten una correlació directa amb els observats en el principal enzim estudiat de la síntesi d'òxid nítric (la iNOS). Podria haver, doncs, una relació a nivell local (M. intercostal), entre la citocina proinflamatòria per excel·lència, el TNF, i la isoforma d'òxid nítric que més s'ha vinculat amb la inflamació sistèmica (iNOS).

En els pacients amb OS, després del tractament amb CPAP, els canvis observats en l'expressió gènica del receptor 1 de TNF (TNFr1) també presentaven una relació

directa amb els canvis produïts en l'expressió de la iNOS, que és l'isoenzim de la sintetasa de l'òxid nítric (NOS) més vinculat als processos inflamatoris via estrès oxidatiu. En un treball ja mencionat del nostre grup (Barreiro 2007) vàrem avaluar l'estrès oxidatiu en els M. intercostals de malalts amb SAHS mesurant a nivell local dos enzims antioxidants, la superòxid dismutasa i la catalasa. No es van trobar diferències significatives en els nivells d'aquests enzims. Més encara, la CPAP no va modificar els nivells de cap dels dos. Tal vegada, en subjectes amb OS, podria haver un major component d'estrès oxidatiu local degut a la presència d'una MPOC associada i, per aquest motiu, els canvis provocats per la CPAP en l'expressió de la iNOS en el nostre estudi, anaven paral·lels als observats en el TNFr1.

Leptina.

Pel que fa a la leptina, je hem comentat que no solament és una molècula implicada en la regulació energètica. En el nostre estudi, en els malalts amb SAHS, l'expressió del gen de la leptina mostrava una tendència a estar disminuïda respecte als individus obesos no comòrbids i, a més, mostrava una correlació positiva amb el receptor 2 de TNF (TNFr2). La relació de la leptina amb els marcadors de la resposta inflamatòria mereix un comentari quelcom més extens.

La leptina és una proteïna que és secretada principalment pels adipòcits. El seu paper en la regulació del pes corporal fou la primera funció que va ser descrita. En el ser humà, les concentracions de leptina en plasma presenten una forta correlació amb paràmetres nutricionals, com són el BMI i la massa de teixit adipós. Inicialment es van descriure uns nivells baixos de leptina en pacients amb MPOC estable que perdien pes i presentaven nivells alts de TNF (Takabatake 1999). Més tard, però, s'han trobat concentracions de leptina augmentades durant les exacerbacions de la MPOC, així com en altres situacions de resposta inflamatòria sistèmica. Altres estudis, alguns més recents, han evidenciat una relació entre la leptina i citocines proinflamatòries com la IL-1, la IL-6 i el TNF (Schols 1999, Çalikoglu 2004). Darrerament, s'ha conegut el paper regulador de la resposta immune de la leptina i s'ha vist que els pacients amb MPOC greu tenien uns nivells d'expressió de leptina augmentats a nivell de les cèl·lules epitelials bronquials i dels macròfags alveolars (Vernooy 2009).

No ens consta cap estudi que hagi estudiat la leptina a l'OS però, probablement, és assumible que el seu comportament estigui lligat als seus dos components, la MPOC i la SAHS. Alguns autors han observat una reducció en les concentracions de leptina quan apliquen el tractament amb CPAP o altres modalitats de ventilació no invasiva a pacients amb la Síndrome d'Hipoventilació-Obesitat (Yee 2006). La relació entre leptina i SAHS pot presentar alguns factors de confusió. Hom sap que la leptina és una citocina pleiotròpica que presenta un ritme circadià en la seva expressió. La leptina, produïda principalment pels adipòcits, es troba augmentada en els individus obesos, que presenten una resistència a la seva acció. Els pacients amb SAHS presenten uns nivells de leptina significativament més alts que els subjectes amb BMI similar que no presenten SAHS. Tal vegada la SAHS potencia la resistència a la leptina ja present en els obesos. D'altra banda, l'increment de leptina en pacients amb SAHS també s'ha associat a la hipòxia nocturna i a la hipercàpnia (López-Jiménez 2008).

Però, apart dels seus efectes sobre la societat, la immunomodulació (proinflamatòria), i alguns paràmetres respiratoris, s'ha vist que uns nivells elevats de leptina indueixen l'activació del sistema nerviós simpàtic i l'agregació plaquetària, que contribueixen als efectes cardiovasculars vinculats a la SAHS (López-Jiménez 2008). De fet, la leptina es considera un factor de risc independent per a la malaltia cardiovascular (Arnardottir 2010). Sembla ser que el tractament amb CPAP disminuïria els nivells de leptina, però aquesta reducció és menys pronunciada en els malalts que no presenten obesitat (Harsch 2003, Barceló 2005).

El nostre grup ha estat el primer en estudiar l'expressió local de leptina a nivell del M. intercostal, i hem trobat una associació entre la seva expressió i la del receptor 2 de TNF, suggerint-se novament un efecte proinflamatori d'aquesta adipocina. Això sembla coherent amb els estudis abans citats que van avaluar la leptina a nivell sistèmic. Tanmateix, a l'igual que passava en altres estudis a nivell plasmàtic, hem vist una tendència al descens en els nivells d'expressió de leptina a nivell muscular després del tractament amb CPAP, si bé no arribaven a la significació estadística.

XIV.7. LIMITACIONS METODOLÒGIQUES DE LA PRESENT TESI DOCTORAL.

Les limitacions del present treball venen donades tant pel tipus de població analitzada com pel propi disseny de l'estudi.

Anàlisi de la població.

Començarem comentant el nombre de pacients inclosos en la present tesi doctoral. En primer lloc voldríem assenyalar que el nombre de subjectes que hem analitzat és comparable al d'altres treballs, tant del nostre grup com d'altres grups d'investigació, en els que ja es va calcular la "n" adequada. Una "n" relativament petita també vindria justificada per tractar-se d'un estudi força invasiu, amb la dificultat afegida de trobar tant pacients com voluntaris sans. Així mateix, hem intentat minimitzar l'agressivitat de les tècniques d'acord amb criteris ètics. Aquesta dificultat en la inclusió de malalts ens ha fet utilitzar mostres de la "mioteca" de la U.R.M.A.R. de l'I.M.I.M., per tal de poder analitzar els 5 grups de pacients, per la qual cosa el treball ha presentat les dues vessants ja comentades: un estudi longitudinal i un altre de casos i controls. A les mancances d'un estudi descriptiu s'afegiria com a punt fort la intervenció terapèutica realitzada en l'estudi prospectiu.

El segon punt que abordarem fa referència a l'homogeneïtat entre els diferents grups de pacients estudiats. Novament, la dificultat en el reclutament de pacients i voluntaris sans ha fet que hi hagués algunes diferències basals entre els 5 grups d'estudi (veure Taules). Donat que teníem la voluntat de donar una visió global que comparés els M. intercostals en diferents grups d'individus (a l'inrevés dels estudis precedents que bàsicament es limitaven a comparacions entre dos grups) hem recorregut a la nostra base històrica de dades. Això ha estat possible gràcies a la nostra experiència com a grup d'investigació en MMRR. Després d'anys d'investigació pensàvem que havia arribat el moment de fer una anàlisi global de la patologia del M. intercostal extern en les diferents poblacions que havíem estudiat.

Per tal de poder fer comparances entre grups, hem intentat obviar el problema del BMI reclutant, a més del grup control d'individus sans, un altre grup de subjectes

obesos sense malalties associades a l'obesitat, que seria el de referència respecte als individus obesos amb SAHS i OS.

Com ja hem comentat en diferents apartats de la tesi, no s'han fet alguns anàlisi en grups d'individus concrets, doncs ja han estat abastament treballats pel nostre equip d'investigació en estudis anteriors i hem considerat que no valia la pena duplicar-los (veure capítols de Metodologia i Resultats). En altres pacients no s'ha pogut fer l'anàlisi de tots els paràmetres desitjats per problemes tècnics.

Limitacions pel que fa a les tècniques.

El anticossos monoclonals emprats per tal d'identificar les cèl.lules inflamatòries a nivell del teixit muscular han estat el CD45 (antigen comú leucocitari) i el CD48 (marcador de macròfags) (veure apartat de Metodologia). Recentment s'ha descobert que aquest darrer marcador "clàssic" de macròfags (CD68) no es troba exclusivament en aquestes cèl.lules, havent-se descrit també en cèl.lules dendrítiques de la pell, cèl.lules mieloides i limfoides, fibroblastes, adipòcits, cèl.lules de la microglia i cèl.lules epitelials (Kunisch 2004, Khazen 2005). Pensem que, malgrat tot, se segueix utilitzant en la pràctica clínica habitual amb força precisió diagnòstica en els laboratoris de Patologia. L'avaluació conjunta amb el marcador comú pels leucòcits (CD45), i la concordança entre ambdós anticossos monoclonals en la determinació del nombre de cèl.lules inflamatòries ens fan considerar que es tracta d'un marcador vàlid per als propòsits del present treball.

Quant a les tècniques immunohistoquímiques, que utilitzen anticossos monoclonals específics, sabem que milloren la resolució de les tècniques histoquímiques però encara no tenen la capacitat de detectar canvis fenotípics inicials en l'expressió de les isoformes de MyHC (únicament ho fan quan una MyHC passa a ser molt majoritària en una fibra). A més, no poden identificar les fibres que contenen predominantment MyHC-IIx. Això, és especialment important en els MMRR, ja que la MyHC-IIx és present a altes concentracions en el diafragma de moltes espècies.

XIV.8. EXPECTATIVES DE FUTUR. IMPLICACIONS TERAPÈUTIQUES.

Ja hem comentat repetidament que una de les troballes rellevants de la present tesi ha estat la presència d'un nombre augmentat de cèl·lules inflamatòries en el M. intercostal extern dels pacients amb SAHS, OS i MPOC. Aquest component inflamatori cel·lular s'acompanya d'un increment de certs mediadors de la inflamació a nivell local. Fenòmens similars, però de menor intensitat, s'observen també en els pacients amb obesitat sense comorbiditat. Com hem vist, nombrosos estudis han evidenciat un component inflamatori tant a nivell sistèmic com a nivell local (vies aèries, pulmons i múscul) en aquelles tres entitats.

D'altra banda, els programes d'entrenament i de rehabilitació pulmonar han demostrat, a la MPOC, una milloria en la capacitat màxima d'esforç, en la resistència i la distància recorreguda en la prova de la marxa i una reducció en la mortalitat d'aquests malalts (Barreiro 2007^b). Part d'aquests efectes deriven d'adaptacions fenotípiques musculars, tant als músculs perifèrics com als respiratoris. De manera semblant, en pacients amb SAHS moderada un entrenament dels M. de la VAS pot reduir el nombre d'apnees i hipopnees durant el son (Puhan 2006). Així, doncs, una milloria en la força contràctil o en la resistència dels M. de la VAS, provocada per l'entrenament durant l'estat de vigília podria significar una millora substancial en la capacitat de mantenir oberta la VAS durant el son.

Un dels mecanismes implicats en els efectes positius per a la salut de l'exercici és la seva capacitat antiinflamatòria. Hem vist, però, com exercicis moderats eren beneficiosos i, en canvi, exercicis extenuants eren lesius pel múscul. Els primers, a més a més, tenen uns efectes cardiovasculars saludables. Per tant, l'exercici físic general podria ser beneficiós de forma més concreta en els pacients amb SAHS, OS i MPOC. No seria tan clar l'efecte de l'exercici específic dels MMRR, doncs sembla ser que, al menys en l'OS i la SAHS, aquests estarien parcialment entrenats. Podria ser que en el cas d'un esforç lesiu els nivells de citocines proinflamatòries fossin excessivament elevats i participessin en els mecanismes moleculars responsables de la lesió. De fet, el nostre grup ha demostrat que indueixen nivells elevats d'estrès oxidatiu. Tanmateix, ja s'ha assenyalat, com nivells moderats de citocines poden tenir relació amb els processos de reparació a nivell muscular.

D'altra banda, és ben coneguda l'eficàcia dels fàrmacs anti-TNF utilitzats en malalts amb Artritis Reumatoide i altres malalties reumàtiques, així com en la malaltia inflamatòria intestinal i la soriassi. Recentment, s'han introduït al mercat nous fàrmacs amb activitat anti-IL-6. Totes aquestes malalties tenen una base immunològica. Potser nous fàrmacs capaços de modular la resposta d'aquestes o d'altres citocines proinflamatòries podrien ser útils, en el futur, per a controlar certes manifestacions de la MPOC o la SAHS. Malauradament, amb els fàrmacs actuals, els primers intents de tractar pacients amb MPOC han esdevingut en un augment de les infeccions i els tumors.

Malgrat l'estrès oxidatiu ha estat abordat de manera marginal en el present treball, hi ha autors que defensen que els mecanismes moleculars implicats en l'estrès oxidatiu presenten un potencial important de cara a introduir futures mesures terapèutiques, doncs constituïrien les dianes per a desenvolupar noves teràpies (Furukawa 2004). Aquestes també tindrien un efecte indirecte sobre la inflamació.

Tanmateix, la determinació de nous mediadors de la inflamació podria ser d'utilitat per tal de guiar un pla terapèutic més específic dels malalts amb MPOC, SAHS i OS. De la mateixa manera que la PCR i la procalcitonina semblen servir per a monitoritzar l'evolució de certes infeccions, altres biomarcadors podrien utilitzar-se per a veure i titular la resposta al tractament (per exemple a la CPAP o a noves modalitats de ventilació no invasiva). Aquest camp dels biomarcadors, sobretot a la SAHS i a l'OS, resta majoritàriament inexplorat.

Respecte a la presència de cèl.lules inflamatòries a nivell muscular, també podríem fer l'hipòtesi que nous fàrmacs amb la capacitat de regular l'activació d'aquestes suposades cèl.lules "centinella" podrien afavorir els mecanismes de reparació muscular o prevenir la cascada inflamatòria que porta a la lesió tissular. Tanmateix, si fóssim capaços de modificar "in vitro" les cèl.lules immunes per tal de programar-les i dirigir-les cap els processos de reparació muscular, podríem utilitzar les tècniques de teràpia cel.lular per infiltrar dites cèl.lules a nivell local i aconseguir la curació o la recuperació funcional del teixit afectat (en aquest cas, el múscul).

En resum, tant nous fàrmacs amb capacitat antiinflamatòria com mesures no farmacològiques, com són els programes d'entrenament general i específic muscular, potser guiats per nous biomarcadors, podrien ser beneficiosos en el futur tractament d'aquests malalts. Nogensmenys, manquen estudis que explorin de forma progressiva aquestes possibilitats terapèutiques.

CONCLUSIONS

XV. CONCLUSIONS.

Seguint el fil argumental de les nostres hipòtesis de treball i objectius, i després d'una anàlisi acurada dels resultats obtinguts en el present treball podem formular les següents conclusions:

1. En situació basal, abans d'administrar el tractament, hi ha un predomini de fibres musculars de tipus I, caracteritzades per ser de contracció lenta y de metabolisme predominantment aeròbic, amb una major resistència a la fatiga, en el M.intercostal extern dels pacients que pateixen alguna de les tres malalties estudiades en la present tesi doctoral: MPOC, OS i SAHS. A més, els dos primers grups tenen un percentatge d'aquestes fibres superior al dels subjectes sans.

Així, doncs, les fibres del M. intercostal extern dels malalts amb les dues entitats que presenten trastorns respiratoris durant el son (SAHS i OS), abans de la intervenció terapèutica presenten un fenotip similar al dels pacients amb MPOC i diferent dels subjectes sans.

Així mateix, dels cinc grups de subjectes estudiats, els pacients amb MPOC i, amb un menor grau els SAHS, mostren una tendència a una major expressió gènica de les isoformes lentes de les cadenes pesants de miosina (MyHC-I). Aquest seria el substracte molecular de les fibres de tipus I i afectaria tant a la proporció com al tamany ("espai ocupat per les fibres").

Sembla haver, doncs, una concordança entre els nivells d'expressió dels gens i el fenotip fibril·lar que presenten tant els pacients com els grups control.

2. Hi ha cèl·lules inflamatòries en els M. intercostals de tots els individus inclosos en el present estudi. Aquestes cèl·lules no formen mai infiltrats inflamatoris i es troben més enllà dels vasos i del teixits pròxims al múscul. És a dir, en el M. intercostal extern es troben de manera fisiològica cèl·lules inflamatòries, tot i que el seu nombre és petit.

Tanmateix, el nombre de leucòcits presents en el M. intercostal és més alt en els pacients que presenten qualsevol de les tres malalties abans esmentades (MPOC, SAHS i OS). La funció d'aquestes cèl·lules, macròfags i leucòcits globals, està per definir, però podria estar relacionada amb els processos de lesió i/o reparació.

En paral·lel, en el M. intercostal extern de tots els grups de pacients i dels controls hem trobat la presència de mediadors químics (citocines) que suggereixen un estat inflamatori a nivell subcel·lular. Els individus amb obesitat presenten un augment de diversos d'aquests mediadors de la inflamació. Per contra, els subjectes sans mostren una major expressió gènica de IL-10 que els tres grups de pacients esmentats, essent aquesta una interleucina amb propietats antiinflamatòries.

Com ja havia descrit el nostre grup en anteriors treballs d'investigació, la expressió local de TNF a l'intercostal es troba augmentada en els pacients amb MPOC respecte a la població sana. Per contra, els pacients amb SAHS i OS tenen un nivell inferior al dels obesos sense comorbiditat. Globalment considerades, aquestes dades podrien interpretar-se com que hi han modulacions de l'estat proinflamatori a nivell del M. intercostal dels pacients amb les tres malalties estudiades (MPOC, SAHS i OS). En els malalts amb MPOC predominaria l'increment de molècules proinflamatòries i en el cas de la SAHS i l'OS el descens dels mediadors antiinflamatoris (IL-10). En aquestes dues darreres entitats els elements lligats a l'augment de càrregues, a la hipoxèmia, o a la pròpia obesitat, probablement serien contrarestats per altres factors.

3. Tot i que millorant, com és conegut, l'estructura del son i la hipoxèmia nocturna, els canvis provocats pel tractament amb CPAP sobre l'estructura molecular del M. intercostal dels pacients amb SAHS i OS són discrets. Malgrat tot, hi ha una disminució en la proporció de fibres de tipus I en els malalts amb SAHS, i una altra tendència a una expressió disminuïda de la isoforma lenta de les cadenes pesants de miosina (MyHC-I) en els pacients amb OS. Totes dues semblen anar en la mateixa direcció: "restituir" un fenotip fibril·lar més "natural", amb menys fibres de tipus I (que són les predominants en aquestes malalties abans de ser tractades), a nivell dels M. intercostals. És probable que la causa sigui un cert efecte de "desentrenament", en reduir-se substancialment els episodis d'apnea, caracteritzats per esforços contràctils dels MMRR en situació d'hipòxia.

El tractament amb CPAP també sembla tenir un cert efecte antiinflamatori sobre els M. intercostals dels pacients amb SAHS, amb una tendència a la disminució de la IL-6 i a l'augment de la IL-10. El mateix tractament millora alguns paràmetres de la funció respiratòria diürna tant en els malalts amb SAHS com en els OS i, a més, millora la força en alguns grups musculars. Això podria estar en relació amb alguns dels canvis moleculars o cel·lulars abans descrits (menor activitat inflamatòria, més proporció de fibres anaeròbiques).

El component MPOC dels pacients amb OS sembla modificar en part els efectes de la CPAP sobre l'organisme, presentant una resposta al tractament molt menys evident a nivell del M. intercostal que la dels malalts amb SAHS.

BIBLIOGRAFIA

XVI. BIBLIOGRAFIA.

Aalbers R, Ayres J, Backer V, Decramer M, Lier PA, Magyar P, Malolepszy J, Ruffin R, Sybrecht GW. Formoterol in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a randomized, controlled, 3-month trial. *Eur Respir J* 2002; 19: 936-943.

Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, Kipnis V, Mouw T, Ballard-Barbash R, Hollenbeck A, Leitzmann MF. Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N Engl J Med* 2006; 355: 763-778.

Aguar MC. Estructura y función de los músculos respiratorios: Desarrollo de un modelo de biopsia ambulatoria. (*Tesi Doctoral*). Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 1995.

Agustí A, Morlá M, Sauleda J, Saus C, Busquets X. NF-kappaB activation and iNOS upregulation in skeletal muscle of patients with COPD and low body weight. *Thorax* 2004; 59: 483-487.

Agustí A, and Soriano JB. Dynamic hyperinflation and pulmonary inflammation: a potentially relevant relationship? *Eur Respir Rev* 2006; 15: 68-71.

Agustí A, Sobradillo P, Celli B. Addressing the complexity of chronic obstructive pulmonary disease. From phenotypes and biomarkers to scale-free networks, systems biology and P4 medicine. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 1129-1137.

Alam I, Lewis K, Stephens JW, Baxter JN. Obesity, metabolic syndrome and sleep apnea: all pro-inflammatory states. *Obesity reviews* 2006; 8: 119-127.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, Editores. *Biología Molecular de la Célula*. 4ª Edición. Barcelona: Ediciones Omega; 2004: pp 907-929 y 949-968.

Alford NJ, Fletcher EC, Nickeson D. Acute oxygen in patients with sleep apnea and COPD. *Chest* 1986; 89: 30-38.

Alonso-Fernández A, García-Río F, Arias MA, Hernanz A, De la Peña M, Piérola J, Barceló A, López-Collazo E, Agustí A. Effects of CPAP on oxidative stress and nitrate efficiency in sleep apnoea: a randomised trial. *Thorax* 2009; 64: 581-586.

American Academy of Sleep Medicine Task Force. Sleep-related breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. *Sleep* 1999; 22: 667-689.

Andersen JI, Schjerling P, Saltin B. Bioquímica del rendimiento atlético. *Investigación y Ciencia*, Noviembre 2000: 4-13.

- Anguera C, Caula J, Castillo JA, Gaitano A, Llauger MA, Pastor E, Rodríguez A.** Malaltia pulmonar obstructiva crònica. (En línia) Barcelona: Institut Català de la Salut, 2009. Guies de pràctica clínica i material docent, núm 16 [URL disponible a: <http://www.gencat.cat/ics/professionals/guies/mpoc/mpoc/htm>].
- Anstead M, Philips B.** The spectrum of sleep-disordered breathing. *Respir Care Clin North Am* 1999; 5: 363-377.
- Antje K, Kratzsch J, Kiess W.** Adipocytokines: leptin-the classical, resistin-the controversial, adiponectin-the promising, and more to more. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19: 525-546.
- Anzueto A.** Impact of exacerbations on COPD. *Eur Respir Rev* 2010, 19: 113-118.
- Arán X.** Els músculs respiratoris a la síndrome d'apnees del son. (*Tesi Doctoral*). Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 1992.
- Arán X, Félez MA, Gea J, Orozco-Levi M, Sauleda J, Broquetas JM.** Fuerza y resistencia de los músculos respiratorios en pacientes con SAHS. Efecto de la aplicación nocturna de CPAP. *Arch Bronconeumol* 1999; 35: 440-445.
- Aranceta J, Pérez-Rodrigo C, Serra L, y miembros del Grupo Colaborativo para el Estudio de la Obesidad en España.** Prevalencia de la obesidad en España: resultados del estudio SEEDO 2000. *Med Clin (Barc)* 2003; 120: 608-612.
- Aravindan N, Aravindan S, Shanmugasundaram K, Shaw AD.** Periods of systemic partial hypoxia induces apoptosis and inflammation in rat skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 2007; 302: 51-58.
- Arnardottir ES, Mackiewicz M, Gislason T, Teff KL, Pack AI.** Molecular signatures of obstructive sleep apnea in adults: a review and perspective. *Sleep* 2009; 32: 447-470.
- Arrizabalaga JJ, Calañas-Continente A, Vidal J, y miembros del Grupo de Trabajo sobre la Obesidad de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición.** Guía de práctica clínica para el manejo del sobrepeso y la obesidad en personas adultas. *Endocrinol Nutr* 2003; 50 (Supl 4): 1-38.
- Auchincloss JH Jr, Cook E, Renzetti AD.** Clinical and physiological aspects of a case of obesity, polycythemia and alveolar hypoventilation. *J Clin Invest* 1955; 34: 1537-1545.
- Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F.** Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 2007; 317: 666-670.
- Austyn JM, Hankins DF, Larsen CP, Morris PJ, Rao AS, Roake JA.** Isolation and characterization of dendritic cells from mouse heart and kidney. *J Immunol* 1994; 152: 2401-2410.

- Baldwin AS, Jr.** The transcription factor NF- κ B and human disease. *J Clin Invest* 2001; 107: 3-6.
- Baldwin KM, Haddad F.** Plasticity in Skeletal, Cardiac, and Smooth Muscle Invited Review: Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *J Appl Physiol* 2001; 90: 345-357.
- Barbé F, Durán-Cantolla J, Capote F, De la Peña M, Chiner E, Masa JF, González M, Marín JM et al., on behalf of the Spanish Sleep and Breathing Group.** Long-term effect of continuous positive airway pressure in hypertensive patients with sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: 718-726.
- Barceló A, Barbé F, Llompарт E, De la Peña M, Durán-Cantolla J, Ladaría A, Bosch M, Guerra L, Agustí AGN.** Neuropeptide Y and leptin in patients with obstructive sleep apnea syndrome. Role of obesity. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 183-187.
- Barreiro E, Ferrer A, Hernández N, Palacio J, Broquetas JM, Gea J.** Does respiratory function modulate the genetic expression of Myosin Heavy Chain isoforms in the diaphragm of COPD patients?. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157 (suppl): A670.
- Barreiro E, Gea J, Corominas JM, Hussain SNA.** Nitric oxide synthases and protein oxidation in the quadriceps femoris of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29: 771-778.
- Barreiro E, De la Puente B, Minguella J, Corominas JM, Serrano S, Hussain SNA, Gea J.** Oxidative stress and respiratory muscle dysfunction in severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 1116-1124.
- Barreiro E, Nowinski A, Gea J, and Sliwinski P.** Oxidative stress in the external intercostal muscles of patients with obstructive sleep apnoea. *Thorax* 2007; 62: 1095-1101.
- Barreiro E, Gea J, Marín J.**^(b) Músculos respiratorios, tolerancia al ejercicio y entrenamiento muscular en la EPOC. *Arch Bronconeumol* 2007; 43 (Supl 3): 15-24.
- Barreiro E, Schols AMWJ, Polkey MI, Gáldiz JB, Gosker HR, Swallow EB, Coronell C, Gea J.** Cytokine profile in quadriceps muscles of patients with severe COPD. *Thorax* 2008; 63: 100-107.
- Bartoccioni E, Gallucci S, Scuderi F, Ricci E, Servidei S, Broccolini A, Tonali P.** MHC class I, MHC class II and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in inflammatory myopathies. *Clin Exp Immunol* 1994; 95: 166-172.
- Beuther DA, Sutherland ER.** Overweight, obesity and incident asthma: a meta-analysis of prospective epidemiologic studies. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 661-666.

Bhowmik A, Seemungal TAR, Sapsford RJ, Wedzicha JA. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax* 2000; 55: 114-120.

Black LF, Hyatt RE. Maximal respiratory pressures: normal values and relationship to age and sex. *Am Rev Respir Dis* 1969; 99: 696-702.

Blanco ML. Capacidad oxidativa de los músculos respiratorios y periféricos en la EPOC. (*Tesi Doctoral*). Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 2003.

Boyd G, Morice AH, Poundsford JC, Siebert M, Pelsis N, Crawford C. An evaluation of salmeterol in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Eur Respir J* 1997; 10: 815-821.

Boyd JH, Petrof BJ, Hamid Q, Fraser R, Kimoff RJ. Upper airway muscle inflammation and denervation changes in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 541-546.

Bradley TD, Butherford A, Lue F, Moldofsky H, Grossmann RF, Zamel N, Phillipson EA. Role of diffuse airway obstruction in the hypercapnia of obstructive apnea. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134: 920-924.

Brambilla D, Barajon I, Bianchi S, Opp MR, Imeri L. Interleukin-1 inhibits putative cholinergic neurons in vitro and REM sleep when microinjected into the rat Laterodorsal Tegmental Nucleus. *Sleep* 2010; 33: 919-929.

Brasó JV, Jorro G. *Manual de Alergia Clínica*, 1ª Edición. Barcelona. Masson, 2003; pp 3-22.

Brochard L, Mancebo J, Wysocki M, Lofaso F, Conti G, Rauss A, Simonneau G, Benito S, et al. Noninvasive ventilation for acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 1995; 333: 775-789.

Broekhuizen R, Wouters EF, Creutzberg EC, Schols AMWJ. Raised CRP levels mark metabolic and functional impairment in advanced COPD. *Thorax* 2006; 61: 17-22.

Broquetas JM. Estructura y función de los músculos respiratorios en la EPOC: Efectos de la hipoxia, hiperoxia, hipercapnia, cambios posturales y ejercicio. (*Tesi Doctoral*). Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 1992.

Bruno A, Chanez P, Chiappara G, Siena L, Giammanco S, Gjomarkaj M, Bonsignore G, Bousquet J, Vignola AM. Does leptin play a cytokine-like role within the airways of COPD patients?. *Eur Respir J* 2005; 26: 398-405.

Burge PS, Calverley PM, Jones PW, Spencer S, Anderson JA, Maslen TK. Randomised, double blind, placebo controlled study of fluticasone propionate in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease: the ISOLDE trial. *BMJ* 2000; 320: 1297-1303.

Burwell CS, Robin ED, Whaley RD, Bickelmann AG. Extreme obesity associated with alveolar hypoventilation: a Pickwickian syndrome. *Am J Med* 1956; 21: 811-818.

Butterfield TA, Best TM, Merrick MA. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: A critical balance between tissue damage and repair. *J Athl Train* 2006; 41: 457-465.

Çalikoglu M, Sahin G, Unlu A, Ozturk C, Tamer L, Ercan B, Kanik A, Atik U. Leptin and TNF-alpha levels in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease and their relationship to nutritional parameters. *Respiration* 2004; 71: 45-50.

Calverley PMA, Koulouris NG. Flow limitation and dynamic hyperinflation: key concepts in modern respiratory physiology. *Eur Respir J* 2005; 25: 186-199.

Calverley PMA, Anderson JA, Celli B, Ferguson GT, Jenkins C, Jones PW, Yates JC, and Vestbo J, for the TORCH investigators. Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2007; 356: 775-789.

Campbell JA, Hughes RL, Sahgal V, Frederiksen J, Shields TW. Alterations in intercostal muscle morphology and biochemistry in patients with obstructive lung disease. *Am Rev Respir Dis* 1980; 122: 679-686.

Caples SM, Gami AS, Somers VK. Obstructive Sleep Apnea. *Ann Intern Med* 2005; 142: 187-197.

Carey IM, Cook DG, Strachan DP. The effects of adiposity and weight change on forced expiratory volume decline in a longitudinal study of adults. *Int J Obes* 1999; 23: 979-985.

Caron MA, Debigaré R, Dekhuijzen PN, Maltais F. Comparative assessment of the quadriceps and the diaphragm in patients with COPD. *J Appl Physiol* 2009; 107: 952-961.

Carrera M, Barbé F, Sauleda J, Tomás M, Gómez C, Agustí AGN. Patients with obstructive sleep apnea exhibit genioglossus dysfunction that is normalized after treatment with continuous positive airway pressure. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1960-1966.

Casadevall C, Coronell C, Ramírez-Sarmiento A, Barreiro E, Orozco-Levi M, Gea J. Local expression of the gene encoding TNF-alpha in the external intercostal and quadriceps muscles of severe COPD patients. *Am J Respir Crit care Med* 2003; 167 (suppl): A29.

Casadevall C, Coronell C, Minguella J, Blanco ML, Orozco-Levi M, Barreiro E, Broquetas J, Gea J. Análisis estructural y expresión de los factores de necrosis tumoral y crecimiento insulina-like en los músculos respiratorios de los pacientes con EPOC. ¿Son válidas las muestras obtenidas en el curso de una toracotomía por neoplasia pulmonar localizada?. *Arch Bronconeumol* 2004; 40: 209-217.

Casadevall C, Barreiro E, Orozco-Levi M, Minguella J, Gea J. Local expression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha: is it the baddy or the goody in the story of respiratory muscle adaptation occurring in COPD? (resum). *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: A26.

Casadevall C, Coronell C, Ramírez-Sarmiento AL, Martínez-Llorens J, Barreiro E, Orozco-Levi M, Gea J. Upregulation of pro-inflammatory cytokines in the intercostal muscles of COPD patients. *Eur Respir J* 2007; 30: 701-707.

Casadevall C, Coronell C, Ramírez-Sarmiento A, Barreiro E, Orozco-Levi M, Gea J. ^(b) Effects of a bout of exhaustive ventilatory effort in the intercostal muscles of severe COPD: expression profiles of local inflammatory and regeneration markers. *Eur Respir J* 2007; 30 (suppl): A4291.

Casadevall C, Coronell C, Ausín P, Martínez-Llorens J, Orozco-Levi M, Barreiro E, Gea J y miembros del grupo ENIGMA in COPD. Citocinas inflamatorias y factores de reparación en los músculos intercostales de pacientes con EPOC grave. *Arch Bronconeumol* 2009; 45: 279-285.

Casanova C, Cote C, Torres JP, Aguirre-Jaime A, Marin JM, Pinto-Plata V, Celli BR. Inspiratory-to-total lung capacity ratio predicts mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 591-597.

Celli BR, Cote CG, Marin JM, Casanova C, Montes de Oca M, Mendez RA, et al. The Body-Mass Index, Airflow Obstruction, Dyspnea, and Exercise Capacity Index in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 1005-1012.

Celli BR, MacNee W, Agustí A, Anzueto A, Berg B, Buist AS, Calverley PMA, Chavannes N, et al. ^(b) American Thoracic Society & European Respiratory Society Task Force. Standards for the diagnosis and treatment of patients with chronic obstructive pulmonary disease: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 2004; 23: 932-946.

Chaouat A, Weitzenblum E, Krieger J, Ifoundza TH, Oswald M, Kessler R. Association of chronic obstructive pulmonary disease and sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 82-86.

Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006; 354: 610-621.

Chen H, Tang Y. Sleep loss impairs inspiratory muscle endurance. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 907-909.

Chen SE, Gerken E, Zhang Y, Zhan M, Mohan RK, Li AS, Reid MB, Li YP. Role of TNF- α signalling in regeneration of cardiotoxin-injured muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 289: C1179-1187.

Chen SE, Jin B, Li YP. TNF- α regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C1660-1671.

Chien M-Y, Wu Y-T, Lee P-L, Chang Y-J, Yang P-C. Inspiratory muscle dysfunction in patients with severe obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 2010; 35: 373-380.

Chin K, Nakamura T, Shimizu K, Mishima M, Nakamura T, Miyasaka M, Ohi M. Effects of nasal continuous positive airway pressure on soluble cell adhesion molecules in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Med* 2000; 109: 562-567.

CIOMS/WHO. International ethical guidelines for biomedical research involving human subjects. Prepared by the Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) in collaboration with the World Health Organization (WHO). Geneva, 2002.

Clanton TL and Levine S. Respiratory muscle fiber remodeling in chronic hyperinflation: dysfunction or adaptation?. *J Appl Physiol* 2009; 107: 324-335.

Codi de Bones Pràctiques Científiques. Centres del Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB). Barcelona, 2007. Es pot consultar a "<http://www.imim.es/media/upload/arxius/cdbp.pdf>".

Connaughton JJ, Catterall JR, Elton RA, Stradling JR, Douglas NJ. Do sleep studies contribute to the management of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 341-344.

Cooper GM, Hausman RE. *The Cell: a molecular approach*, 4th Edition. Washington. ASM Press, 2007: pp 473-528.

Coronell C, Ramírez-Sarmiento A, Martínez-Llorens JM, Barreiro E, Orozco-Levi M, Gea J. Cytokine expression in the external intercostal muscle of subjects with normal lung function. *Eur Respir J* 2002; 20 (suppl 38): 496s.

Coronell C, Martínez-Llorens JM, Ramírez-Sarmiento A, Orozco-Levi M, Barreiro E, Gea J. Cytokine expression at the external intercostals of healthy human beings. Effects of ageing, gender and exhaustive specific exercise. *Am J Respir Crit care Med* 2003; 167 (suppl): A27.

Coronell C. Disfunció muscular en malalts amb MPOC. (*Tesi Doctoral*). Barcelona: Universitat Pompeu Fabra; 2006.

Crummy F, Piper AJ, Naughton MT. Obesity and the lung: 2. Obesity and sleep-disordered breathing.. *Thorax* 2008; 63: 738-746.

Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, Gallimore JR, Pepys MB. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *BMJ* 2000; 321: 199-204.

Davis G, Patel JA, Gagne DJ. Pulmonary considerations in obesity and the bariatric surgical patient. *Med Clin N Am* 2007; 91: 433-442.

De la Peña M, Serpero LD, Barceló A, Barbé F, Agustí A, Gozal D. Inflammatory proteins in patients with obstructive sleep apnea with and without daytime sleepiness. *Sleep Breath* 2007; 11: 177-185.

De Pablos PL, Martínez FJ. Significado clínico de la obesidad abdominal. *Endocrinol Nutr* 2007; 54: 265-271.

De Troyer A, Legrand A, Wilson TA. Rostrocaudal gradient of mechanical advantage in the parasternal intercostal muscles of the dog. *J Physiol* 1996; 495: 239-246.

De Troyer A, Legrand A, Gevenois PA, Wilson TA. Mechanical advantage of the human parasternal intercostal and triangularis sterni muscles. *J Physiol* 1998; 513: 915-925.

De Troyer A, Kirkwood PA, Wilson TA. Respiratory action of the intercostal muscles. *Physiol Rev* 2005; 85: 717-756.

Debigare R, Cote CH, Maltais F. Peripheral muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease. Clinical relevance and mechanisms. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1712-1717.

Décary A, Rouleau I, Montplaisir J. Cognitive deficits associated with sleep apnea syndrome: a proposed neuropsychological test battery. *Sleep* 2000; 23: 1-13.

Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, O'Donnell CP. Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol Rev* 2010; 90: 47-112.

Donaldson GC, Seemungal TAR, Bhowmik A, Wedzicha JA. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2002; 57: 847-852.

Donaldson GC, Seemungal TA, Patel IS, Bhowmik A, Wilkinson TM, Hurst JR, Maccallum PK, Wedzicha JA. Airway and systemic inflammation and decline in lung function in patients with COPD. *Chest* 2005; 128: 1995-2004.

Doucet M, Debigaré R, Joanisse DR, Cote C, Leblanc P, Gregoire J, Deslauriers J, Vaillancourt R, Maltais F. Adaptation of the diaphragm and the vastus lateralis in mild-to-moderate COPD. *Eur Respir J* 2004; 24: 971-979.

Douglas NJ, Flenley DC. Breathing during sleep in patients with obstructive lung disease. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 1055-1070.

Drummond M, Winck J, Guimaraes J, Santos AC, Almeida J, Marques J. Efecto a largo plazo de la presión positiva automática en la vía aérea sobre la proteína C reactiva y la interleucina-6 en varones con síndrome de apnea obstructiva del sueño. *Arch Bronconeumol* 2009; 45: 577-584.

Durán-Cantolla J, Mar J, De la Torre G, Rubio R, Guerra L. El Síndrome de Apneas-Hipopneas durante el Sueño (SAHS) en España. Disponibilidad de recursos para su diagnóstico y tratamiento en los hospitales del estado español. *Arch Bronconeumol* 2004; 40: 259-267.

Dyugovskaya L, Lavie P, Lavie L. Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 934-939.

Dyugovskaya L, Lavie P, Lavie L. Phenotypic and functional characterization of blood $\gamma\delta$ T cells in sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 242-249.

Dyugovskaya L, Lavie P, Hirsh M, Lavie L. Activated CD8+ T-lymphocytes in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 2005; 25: 820-828.

Dyugovskaya L, Polyakov A, Lavie P, Lavie L. Delayed neutrophil apoptosis in patients with sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 544-554.

Eckert DJ, Saboisky JP, Jordan AS, Malhotra A. Upper airway myopathy is not important in the pathophysiology of obstructive sleep apnea. *J Clin Sleep Med* 2007; 6: 570-573.

Edström L, Larsson H, Larsson L. Neurogenic effects on the palatopharyngeal muscle in patients with obstructive sleep apnoea: a muscle biopsy study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 55: 916-920.

El Solh AA, Mador MJ, Sikka P, et al. Adhesion molecules in patients with coronary artery disease and moderate-to-severe obstructive sleep apnea. *Chest* 2002; 121: 1541-1547.

Entzian P, Linnemann K, Schlaak M, Zabel P. Obstructive sleep apnea syndrome and circadian rhythms of hormones and cytokines. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1080-1086.

Fabbri LM, Calverley PMA, Izquierdo-Alonso JL, Bundschuh DS, Brose M, Martínez FJ, Rabe KF, for the M2-127 and M2-128 study groups. Roflumilast in moderate-to-severe chronic obstructive pulmonary disease treated with longacting bronchodilators: two randomised clinical trials. *Lancet* 2009; 374: 695-703.

Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation and haematopoiesis. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 437-446.

Febbraio MA, Pedersen BK. Muscle derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J* 2002; 16: 1335-1347.

Félez MA. Función de los músculos respiratorios en el síndrome de apneas-hipopneas durante el sueño. *Arch Bronconeumol* 2002; 38: 278-280.

Ferini-Strambi LJ, Smirne S, Moz U, Sferrazza B, Iannaccone S. Muscle fibre type and obstructive sleep apnea. *Sleep Res Online* 1998; 1: 24-27.

Flenley DC. Sleep in chronic obstructive lung disease. *Clin Chest Med* 1985; 6: 651-661.

Fletcher EC, Schaal JM, Miller J, Fletcher JG. Long-term cardiopulmonary sequelae in patients with sleep apnea and chronic lung disease. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 525-533.

Foz M, Llauradó E, Ramis J, Editors. *Diccionari Enciclopèdic de Medicina*. 2a Edició. Barcelona: Enciclopèdia Catalana; 2000.

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004; 114: 1752-1761.

Gandevia SC, Hudson AL, Gorman RB, Butler JE, De Troyer A. Spatial distribution of inspiratory drive to the parasternal intercostal muscles in humans. *J Physiol* 2006; 573: 263-275.

Garrido G. En "SPSS aplicado a las Ciencias de la Salud". RA-MA Editorial. Madrid. 2002.

Gay PC. Chronic obstructive pulmonary disease and sleep. *Respir Care* 2004; 49: 39-51.

Gea J, Orozco-Leví M, Aguar MC, Félez MA, Sauleda J, Pastó M, Broquetas JM. Adaptive changes concerning the type of fibres and isoforms of myosin in the external intercostal muscle of COPD patients. *Eur Respir J* 1996; 9: 160S.

Gea J. Myosin gene expression in the respiratory muscles. *Eur Respir J* 1997; 10: 2404-2410.

Gea J, Hamid Q, Czaika G, Zhu E, Mohan-Ram V, Goldspink G, Grassino A. Expression of myosin heavy-chain isoforms in the respiratory muscles following inspiratory resistive breathing. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1274-1278.

Gea J y Barreiro E. Actualización en los mecanismos de disfunción muscular en la EPOC. *Arch Bronconeumol* 2008; 44: 328-337.

Gea J, Martínez-Llorens J, Ausín P. Disfunción muscular esquelética en la EPOC. *Arch Bronconeumol* 2009; 45 (Supl 4): 36-41.

Giles TL, Lasserson TJ, Smith BJ, White J, Wright J, Cates CJ. Continuous positive airways pressure for obstructive sleep apnoea in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2006, Issue 2. Art. No.: CD001106. DOI: 10.1002 / 14651858. CD001106.pub3

Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Rev Immunol* 2005; 5: 953-964.

Gosker HR, Engelen MP, van Mameren H, van Dijk PJ, van der Vusse GJ, Wouters EFM, Schols AMWJ. Muscle fiber type IIx atrophy is involved in the loss of fat-free mass in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 113-119.

Gosker HR, van Mameren H, van Dijk PJ, Engelen MP, van der Vusse GJ, Wouters EFM, Schols AMWJ.^(b) Skeletal muscle fibre-type shifting and metabolic profile in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2002; 19: 617-625.

Gosker HR, Kubat B, Schaart G, van der Vusse GJ, Wouters EFM, Schols AMWJ. Myopathological features in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 22: 280-285.

Gosselin LE, Barkley JE, Spencer MJ, McCormick KM, Farkas GA. Ventilatory dysfunction in mdx mice: impact of tumor necrosis factor- α deletion. *Muscle Nerve* 2003; 28: 336-343.

Gozal D and Kheirandish-Gozal L. Cardiovascular morbidity in Obstructive Sleep Apnea. Oxidative stress, inflammation, and much more. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 369-375.

Gozal D, Serpero LD, Kheirandish-Gozal L, Capdevila OS, Khalyfa A, Tauman R. Sleep measures and morning plasma TNF- α levels in children with sleep-disordered breathing. *Sleep* 2010; 33: 319-325.

Grupo Español de Sueño. Consenso Nacional sobre el Síndrome de Apneas-Hipopneas del Sueño (SAHS). *Arch Bronconeumol* 2005; 41 Supl 4: 5-110.

Guilleminault C, Eldridge FL, Dement WC. Insomnia with sleep apnea: a new syndrome. *Science* 1973; 181: 856-858.

Guilleminault C, Tilkian A, Dement WC. The sleep apnea syndromes. *Annu Rev Med* 1976; 27: 465-485.

Guilleminault C, Kirisoglu C, Ohayon MM. C-reactive protein and sleep-disordered breathing. *Sleep* 2004; 27: 1507-1511.

Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiología Médica*, 10^a Edición. México. McGraw-Hill Interamericana, 2001: pp 79-93.

- Hamberger GE.** *De Respirationis Mechanismo et usu Gennino.* Iena: Christoph Croeker, 1749.
- Hards JM, Reid WD, Pardy RL, Paré PD.** Respiratory muscle fiber morphometry. Correlation with pulmonary function and nutrition. *Chest* 1990; 97: 1037-1044.
- Harsch IA, Konturek PC, Koebnick C, Kuehnlein PP, Fuchs FS, Pour Schahin S, Wiest GH, Hahn EG, Lohmann T, Ficker JH.** Leptin and ghrelin levels in patients with obstructive sleep apnoea: effect of CPAP treatment. *Eur Respir J* 2003; 22: 251-257.
- Hatipoglu U, Rubenstein I.** Inflammation and obstructive sleep apnoea syndrome pathogenesis: a working hypothesis. *Respiration* 2003; 70: 665-671.
- He J, Watkins S, Kelley DE.** Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity. *Diabetes* 2001; 50: 817-823.
- Henderson RB, Hobbs JAR, Mathies M, Hogg N.** Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. *Blood* 2003; 102: 328-335.
- Holguin F, Fitzpatrick A.** Obesity, asthma, and oxidative stress. *J Appl Physiol* 2010; 108: 754-759.
- Holmes N.** CD45: all is not yet crystal clear. *Immunology* 2005; 117: 145-155.
- Horner RL.** Respiratory motor activity: influence of neuromodulators and implications for sleep disordered breathing. *Can J Physiol Pharmacol* 2007; 85: 155-165.
- Htoo AK, Greenberg H, Tongia S, Chen G, Henderson T, Wilson D, Liu SF.** Activation of nuclear factor kappaB in obstructive sleep apnea: a pathway leading to systemic inflammation. *Sleep Breath* 2006; 10: 43-50.
- Hughes RL, Katz H, Sahgal V, Campbell JA, Hartz R, Shields TW.** Fiber size and energy metabolites in five separate muscles from patients with chronic obstructive lung disease. *Respiration* 1983; 44: 321-328.
- Institut d'Estudis Catalans.** *Diccionari de la llengua catalana.* 2a Edició. Barcelona: Edicions 62/Enciclopèdia Catalana; 2007.
- Jagoe RT, Engelen MP.** Muscle wasting and changes in muscle protein metabolism in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 46 (Suppl): 52s-63s.
- Jakobsson P, Jorfeldt L, Henriksson J.** Metabolic enzyme activity in the quadriceps femoris muscle in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit care Med* 1995; 151: 374-77.

Ji SQ, Neustrom S, Willis GM, Spurlock ME. Proinflammatory cytokines regulate myogenic cell proliferation and fusion but have no impact on myotube protein metabolism or stress protein expression. *Interferon Cytokine Res* 1998; 18: 879-888.

Jiménez-Fuentes MA, Gea J, Pallás O, Gallego F, Félez MA, Broquetas JM. Morfometría fibrilar del músculo intercostal externo. Comparación entre los lados dominante y no dominante en pacientes con EPOC severa. *Arch Bronconeumol* 1998; 34: 189-193.

Jiménez-Fuentes MA, Gea J, Aguar MC, Minguella J, Lloreta J, Félez M, Broquetas JM. Densidad capilar y función respiratoria en el músculo intercostal externo. *Arch Bronconeumol* 1999; 35: 471-476.

Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth Sleepiness Scale. *Sleep* 1991; 14: 540-545.

Johnson MW, Remmers JE. Accessory muscle activity during sleep in chronic obstructive pulmonary disease. *J Appl Physiol* 1984; 57: 1011-1017.

Jubber AS. Respiratory complications of obesity. *Int J Clin Pract* 2004; 58: 573-80.

Keaney JF, Larson MG, Vasan RS, Wilson PWF, Lipinska I, Corey D, Massaro JM, Sutherland P, et al. Obesity and systemic oxidative stress. Clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 434-439.

Kessler R, Chaouat A, Weitzenblum E, Oswald M, Ehrhart M, Apprill M, Krieger J. Pulmonary hypertension in the obstructive sleep apnoea syndrome: prevalence, causes and therapeutic consequences. *Eur Respir J* 1996; 9: 787-794.

Kessler R, Chaouat A, Schinkewitch Ph, Faller M, Casel S, Krieger J, Weitzenblum E. The obesity-hypoventilation syndrome revisited: a prospective study of 34 consecutive cases. *Chest* 2001; 120: 369-376.

Khazen W, M'Bika JP, Tomkiewicz C, Benelli C, Chany C, Achour A, Forest C. Expression macrophage-selective markers in human and rodent adipocytes. *FEBS* 2005; 579: 5631-5634.

Kimoff RJ. Upper airway myopathy is important in the pathophysiology of obstructive sleep apnea. *J Clin Sleep Med* 2007; 6: 567-569.

Kolb-Bachofen V, Kuhn A, Suschek CV. The role of nitric oxide. *Rheumatology* 2006; 45 (Suppl 3): iii17-iii19.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Robbins y Cotran: Patología estructural y funcional*, 7ª Edición. Madrid. Elsevier, 2005: pp 47-86.

Kunisch E, Fuhrmann R, Roth A, Winter R, Lungershausen W, Kinne RW. Macrophage specificity of three anti-CD68 monoclonal antibodies (KP1, EBM11, PGM1) widely used for immunohistochemistry and flow cytometry. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 774-784.

Kushida CA, Litner MR, Morgenthaler T, Alessi CA, Bailey D, Coleman J, Friedman L, Hirshkowitz M, et al. Practice parameters for the indications for polysomnography and related procedures: an update for 2005. *Sleep* 2005; 38: 499-521.

Kutsuzawa T, Shioya S, Kurita D, Haida M, Ohta Y, Yamabayashi H. Muscle energy metabolism and nutritional status in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a 31P magnetic resonance study. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 647-652.

Lacasse Y, Goldstein R, Lasserson TJ, Martin S. Rehabilitación pulmonar para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Revisión Cochrane traducida). En: *La Biblioteca Cochrane Plus, 2008 Número 4*. Oxford: Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>. (Traducida de The Cochrane Library, 2008 Issue 3. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.).

Lacedonia D, Salerno FG, Sabato R, Carpagnano G, Aliani M, Palladino GP, Foschino Barbaro MP. Airway cell patterns in patients suffering from COPD and OSAS (Overlap Syndrome). *Respir Med* 2011; 105: 303-309.

Langen RCJ, Schols AMWJ, Kelders MCJ, van der Velden JLJ, Wouters EFM, Janssen-Heininger YMW. Muscle wasting and impaired muscle regeneration in a murine model of chronic pulmonary inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 35: 689-696.

Langen RCJ and Schols AMWJ. Inflammation: friend or foe of muscle remodelling in COPD?. *Eur Respir J* 2007; 30: 605-607.

Lavie L. Obstructive sleep apnoea syndrome: an oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev* 2003; 7: 35-51.

Legrand A, Schneider E, Gevenois PA, De Troyer A. Respiratory effects of the scalene and sternomastoid muscles in humans. *J Appl Physiol* 2003; 94: 1467-1472.

Levine S, Nguyen T, Kaiser LR, Rubinstein NA, Maislin G, Gregory C, Rome LC, Dudley GA, Sieck GC, Shrager JB. Human diaphragm remodeling associated with chronic obstructive pulmonary disease. Clinical implications. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 706-713.

Levine S, Nguyen T, Friscia M, Zhu J, Szeto W, Tikunov BA, Kucharczuk JC, Rubinstein NA, Kaiser LR, Shrager J. Parasternal intercostal muscle remodeling in severe chronic obstructive pulmonary disease. *J Appl Physiol* 2006; 101: 1297-1302.

Li X, Moody MR, Engel D, Walker S, Clubb FJ, Sivasubramanian N, Mann DL, Reid MB. Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- α causes oxidative stress and contractile dysfunction in mouse diaphragm. *Circulation* 2000; 102: 1690-1696.

Lieberman DA, Faulkner JA, Craig AB, Maxwell LC. Performance and histochemical composition of guinea pig and human diaphragm. *J Appl Physiol* 1973; 34: 233-237.

Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 2001; 25: 402-408.

López-Jiménez F, Sert Kuniyoshi FH, Gami A, Somers VK. Obstructive sleep apnea. Implications for cardiac and vascular disease. *Chest* 2008; 133: 793-804.

López-Soriano J, Chiellini C, Maffei M, Grimaldi PA, Argilés JM. Roles of skeletal muscle and peroxisome proliferator-activated receptors in the development and treatment of obesity. *Endocrine Reviews* 2006; 27: 318-329.

Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 2011; 121: 2111-2117.

Lundberg IE, Nyberg P. New developments in the role of cytokines and chemokines in inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 1998; 10: 521-529.

MacGowan NA, Evans KG, Road JD, Reid WD. Diaphragm injury in individuals with airflow obstruction. *Am J Respir Crit care Med* 2001; 163: 1654-1659.

Mahler DA and Criner GJ. Assessment tools for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Do newer metrics allow for disease modification? *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4: 507-511.

Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I. *Immunology*, Seventh Edition. Philadelphia, USA. Elsevier, 2006: p 15.

Malenfant P, Joanisse DR, Thériault R, Goodpaster BH, Kelley DE, Simoneau JA. Fat content in individual muscle fibers of lean and obese subjects. *Int J Obesity* 2001; 25: 1316-1321.

Malhotra A, White DP. Obstructive Sleep Apnoea. *Lancet* 2002; 360: 237-245.

Maltais F, Simard AA, Simard C, Jobin J, Desgagnés P, LeBlanc P. Oxidative capacity of the skeletal muscle and acid lactic kinetics during exercise in normal subjects and in patients with COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 288-293.

Mancuso P. Obesity and lung inflammation. *J Appl Physiol* 2010; 108: 722-728.

Marín JM, Carrizo SJ, Vicente E, Agustí AGN. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet* 2005; 365: 1046-1053.

Martínez-García MA, Soler-Cataluña JJ, Ejarque-Martínez L, Soriano Y, Román-Sánchez P, Barbé F, Montserrat JM, Durán-Cantolla J. Continuous positive airway pressure treatment reduces mortality in patients with ischemic stroke and obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180: 36-41.

Martínez-Llorens J. Cèl·lules satèl·lit i miogènesi en els músculs esquelètics dels pacients amb MPOC. (*Tesi Doctoral*). Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 2004.

Martínez-Llorens J, Orozco-Levi M, Masdeu MJ, Coronell C, Ramírez-Sarmiento A, Broquetas JM, Gea J. ^(b) Disfunción muscular global durante la exacerbación de la EPOC: Un estudio de cohortes. *Med Clin (Barc)* 2004; 122: 521-527.

Martínez-Llorens J, Casadevall C, Lloreta J, Orozco-Levi M, Barreiro E, Broquetas J y Gea J. Activación de células satélite en el músculo intercostal de pacientes con EPOC. *Arch Bronconeumol* 2008; 44: 239-244.

Martínez-Llorens J, Ramírez M, Colomina MJ, Bagó J, Molina A, Cáceres E, Gea J. Muscle dysfunction and exercise limitation in adolescent idiopathic scoliosis. *Eur Respir J* 2010; 36: 393-400.

Mathiowetz V, Kashman N, Volland G, Weber K, Dowe M, Rogers S. Grip and pinch strength: normative data for adults. *Arch Phys Med Rehabil* 1985; 66: 69-74.

Mathur N and Pedersen BK. Exercise as a mean to control low-grade systemic inflammation. *Mediators of Inflammation* 2008; Article ID 109502. doi:10.1155/2008/109502.

McClean KM, Kee F, Young IS, Elborn JS. Obesity and the lung: 1. Epidemiology. *Thorax* 2008; 63: 649-654.

McKenzie D. To breathe or not to breathe: the respiratory muscles and COPD. *J Appl Physiol* 2006; 101: 1279-1280.

McNicholas WT. Impact of sleep in COPD. *Chest* 2000; 117: 48S-53S.

McNicholas WT. Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Obstructive Sleep Apnea. Overlaps in pathophysiology, systemic inflammation, and cardiovascular disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180: 692-700.

Mezzanotte WS, Tangel DJ, White DP. Waking genioglossal electromyogram in sleep apnea patients versus normal controls (a neuromuscular compensatory mechanism). *J Clin Invest* 1992; 89: 1571-1579.

Minoguchi K, Tazaki T, Yokoe T, Minoguchi H, Watanabe Y, Yamamoto M, Adachi M. Elevated production of tumor necrosis factor-alpha by monocytes in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Chest* 2004; 126: 1473-1479.

Miravittles M. Prevention of exacerbations of COPD with pharmacotherapy. *Eur Respir Rev* 2010, 19: 119-126.

Mizuno M, Secher NH, Saltin B. Fibre types, capillary supply and enzyme activities in human intercostal muscles. *Clin Physiol* 1985; 5: 121-135.

Mizuno M, Secher NH. Histochemical characteristics of human expiratory and inspiratory intercostal muscles. *J Appl Physiol* 1989; 67: 592-598.

Mizuno M. Human respiratory muscles: fibre morphology and capillary supply. *Eur Respir J* 1991; 4: 587-601.

Mokhlesi B, Kryger MH, Grunstein RR. Assessment and management of patients with obesity hypoventilation syndrome. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5: 218-225.

Mokhlesi B, K. Obesity hypoventilation syndrome: A state-of-the-art review. *Respir Care* 2010; 55: 1347-1362.

Montes de Oca M, Torres SH, De Sanctis J, Mata A, Hernández N, Tálamo C. Skeletal muscle inflammation and nitric oxide in patients with COPD. *Eur Respir J* 2005; 26: 390-397.

Montserrat JM, Kosmas EN, Cosio MG, Kimoff RJ. Mechanism of apnea lengthening across the night in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 988-993.

Montserrat JM, Kosmas EN, Cosio MG, Kimoff RJ. Lack of evidence for diaphragmatic fatigue over the course of the night in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 1997; 10: 133-138.

Montserrat JM. "Síndrome de apneas durante el sueño". En Ferreras-Rozman, Medicina Interna, 15ª Edición. Elsevier. Madrid. 2004: pp 775-780.

Morales P, Sanchís J, Lamb PJ, Díez JL. Maximum static respiratory pressures in adults. The reference values for a Mediterranean Caucasian population. *Arch Bronconeumol* 2007; 33: 213-219.

Morrison WL, Gibson JN, Scrimgeour C, et al. Muscle wasting in emphysema. *Clin Sci (Lond)* 1988; 75: 415-420.

Mota S, Güell R, Barreiro E, Casan P, Gea J, Sanchis J. Relación entre disfunción de los músculos espiratorios e hiperinflación dinámica en la EPOC avanzada. *Arch Bronconeumol* 2009; 45: 487-495.

- Nagaraju K.** Immunological capabilities of skeletal muscle cells. *Acta Physiol Scand* 2001; 171: 215-223.
- Nakamura T, Chin K, Shimizu K, Kita H, Mishima M, Nakamura T, Ohi M.** Acute effect of nasal continuous positive airway pressure therapy on the systemic immunity of patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep* 2001; 24: 545-553.
- Nieto FJ, Young TB, Lind BK, Shahar E, Samet JM, Redline S, D'Agostino RB, Newman AB, et al., for the Sleep Heart Health Study.** Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. Sleep Heart Health Study. *JAMA* 2000; 283: 1829-1836.
- Noguera A, Busquets X, Sauleda J, Villaverde JM, Mac Nee W, Agustí AGN.** Expression of adhesion molecules and G proteins in circulating neutrophils in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1664-1668.
- O'Donnell DE, Flüge T, Gerken F, Hamilton A, Webb K, Aguilaniu B, Make B, Magnussen H.** Effects of tiotropium on lung hyperinflation, dyspnoea and exercise tolerance in COPD. *Eur Respir J* 2004; 23: 832-840.
- Orozco-Levi M.** Cambios adaptativos en la estructura subcelular del diafragma humano: Asociaciones con la EPOC. (*Tesi Doctoral*). Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 1995.
- Orozco-Levi M, Gea J, Monells J, Arán X, Aguar MC, Broquetas JM.** ^(b) Activity of *latissimus dorsi* muscle during inspiratory threshold loads. *Eur Respir J* 1995; 8: 441-445.
- Orozco-Levi M, Gea J, Aguar MC, Martin-Campos J, Broquetas JM.** Changes in myosin expression in external intercostal muscles of COPD patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155 (suppl): A510.
- Orozco-Levi M.** Structure and function of the respiratory muscles in patients with COPD: impairment or adaptation?. *Eur Respir J* 2003; Suppl 46: 41s-51s.
- Ottenheijm CAC, Heunks LMA, and Dekhuijzen PNR.** Diaphragm Muscle Fiber Dysfunction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Toward a Pathophysiological Concept. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 1233-1240.
- Pajak B, Orzechowska S, Pijet B, Pijet M, Pogorzelska A, Gajkowska B, Orzechowski A.** Crossroads of cytokine signaling. The chase to stop muscle cachexia. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59 (suppl.9): 251-264.
- Palacio J, Gáldiz JB, Bech JJ, Mariñán M, Casadevall C, Martínez P, Gea J.** Expresión de los genes de la interleucina 10 (IL-10) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en músculos respiratorios y periféricos. Relación con el daño sarcolémico. *Arch Bronconeumol* 2002; 38: 311-316.

Papanicolaou DA, Tsigos C, Oldfield EH, Chrousos GP. Acute glucocorticoid deficiency is associated with plasma elevations of interleukin-6: does the latter participate in the symptomatology of the steroid withdrawal syndrome and adrenal insufficiency?. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2303-2306.

Pardoll DM, Beckerleg AM. Exposing the immunology of naked DNA vaccines. *Immunity* 1995; 3: 165-169.

Pascual S, Casadevall C, Martínez-Llorens J, Ausín P, Orozco-Lleví M, Barreiro E, Gea J. Functional blockade of TNF-alpha and myogenic differentiation in cells from peripheral muscles of COPD patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183 (electronic suppl): A4264.

Pastó M. Función respiratoria, proteínas estructurales y actividad enzimática del diafragma. (*Tesis Doctoral*). Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 1998.

Pastó M, Gea J, Blanco ML, Orozco-Levi M, Pallás O, Masdeu MJ, Broquetas JM. Actividad metabólica del músculo intercostal externo en pacientes con EPOC. *Arch Bronconeumol* 2001; 37: 108-114.

Paulsen FP, Steven P, Tsokos M, Jungmann K, Muller A, Verse T, Pirsig W. Upper airway epithelial structural changes in obstructive sleep-disordered breathing. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 501-509.

Pauwels RA, Löfdahl CG, Laitinen LA, Schouten JP, Postma DS, Pride NB, Ohlsson SV, for the European Respiratory Society Study on Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Long-term treatment with inhaled budesonide in persons with mild chronic obstructive pulmonary disease who continue smoking. European Respiratory Society Study on Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 1948-1953.

Peces-Barba G, Barberá JA, Agustí A, Casanova C, Casas A, Izquierdo JL, Jardim J, López Varela V, et al. Guía clínica SEPAR-ALAT de diagnóstico y tratamiento de la EPOC. *Arch Bronconeumol* 2008; 44: 271-281.

Pedersen BK, Ostrowski K, Rohde T, Bruunsgaard H. The cytokine response to strenuous exercise. *Can J Physiol Pharmacol* 1998; 76: 505-511.

Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev* 2008; 88: 1379-1406.

Pedersen BK. Edward F Adolph distinguished lecture: Muscle as an endocrine organ: IL-6 and other myokines. *J Appl Physiol* 2009; 107: 1006-1014.

Peker Y, Hedner J, Norum J, Kraiczi H, Carlson J. Increased incidence of cardiovascular disease in middle-aged men with obstructive sleep apnea: a 7-year follow-up. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 159-165.

Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, Crapo RO, Burgos F, Casaburi R, Coates A, van der Grinten CPM, et al. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J* 2005; 26: 948-968.

Peppard PE, Young T, Palta M, Skatrud J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med* 2000; 342: 1378-1384.

Peppard PE, Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J.^(b) Longitudinal study of moderate weight change and sleep-disordered breathing. *JAMA* 2000; 284: 3015-3021.

Pi-Sunyer X. The metabolic syndrome: How to approach differing definitions. *Med Clin N Am* 2007; 91: 1025-1040.

Pinto-Plata VM, Livnat G, Girish M, Cabral H, Masdin P, Linacre P, Dew R, Kenney L, Celli BR. Systemic cytokines, clinical and physiological changes in patients hospitalized for exacerbation of COPD. *Chest* 2007; 131: 37-43.

Piper AJ, Wang D, Yee BJ, Barnes DJ, Grunstein RR. Randomised trial of CPAP vs bilevel support in the treatment of obesity hypoventilation syndrome without severe nocturnal desaturation. *Thorax* 2008; 63: 395-401.

Plant PK, Owen JL, Elliott MW. Early use of non-invasive ventilation for acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease on general respiratory wards: a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2000; 355: 1931-35.

Polla B, D'Antona G, Bottinelli R, Reggiani C. Respiratory muscle fibres: specialisation and plasticity. *Thorax* 2004; 59: 808-817.

Puhan MA, Suarez A, Lo CC, Zahn A, Heitz M, Braendli O. Didgeridoo playing as alternative treatment for obstructive sleep apnoea syndrome: randomised controlled trial. *Br Med J* 2006; 332: 266-270.

Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault JC. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official State of the European Respiratory Society. *Eur Respir J* 1993; Suppl 16: 5-40.

Rabe KF, Bateman ED, O'Donnell D, Witte S, Bredenbröker D, Bethke TD. Roflumilast – an oral anti-inflammatory treatment for chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet* 2005; 366: 563-571.

Rabinovich RA, Ardite E, Troosters T, Carbó N, Alonso J, González de Suso JM, Vilaró J, Barberá JA, et al. Reduced muscle redox capacity after endurance training in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1114-1118.

Ramírez-Sarmiento A, Orozco-Leví M, Güell R, Barreiro E, Hernández N, Mota S, Sangenís M, Broquetas JM, Casan P, Gea J. Inspiratory muscle training in patients with chronic obstructive pulmonary disease: structural adaptation and physiologic outcomes. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 1491-1497.

Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, De Tullio R, Dayer JM, Brienza A, Bruno F, Slutsky AS. Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. A randomized controlled trial. *JAMA* 1999; 282: 54-61.

Reid MB, Lännergren J, Westerblad H. Respiratory and limb muscle weakness induced by tumor necrosis factor- α . Involvement of muscle myofilaments. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 479-484.

Remels AH, Gosker HR, van der Velden J, Langen RC, Schols AM. Systemic inflammation and skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: State of the art and novel insights in regulation of muscle plasticity. *Clin Chest Med* 2007; 28: 537-552.

Remmers JE, de Groot WJ, Sauerland EK, Anch AM. Pathogenesis of upper airway occlusion during sleep. *J Appl Physiol* 1978; 44: 931-938.

Roca J, Sanchís J, Agustí-Vidal A, Segarra F, Navajas D, Rodríguez-Roisín R, et al. Spirometric reference values from a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1986; 22: 217-224.

Roca J, Rodríguez-Roisín R, Cobo E, Burgos F, Pérez J, Clausen JL. Single-breath carbon monoxide diffusing capacity prediction equations from a Mediterranean population. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 1026-1032.

Roca J, Burgos F, Barberá JA, Sunyer J, Rodríguez-Roisín R, Castellsagué J, et al. Prediction equations for plethysmographic lung volumes. *Respir Med* 1998; 92: 454-460.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-809.

Rouvière H, Delmas A. *Anatomía Humana*, 10ª Edición. Barcelona. Masson, 2002: Tomo II: pp 84-86.

Roytblat L, Rachinsky M, Fisher A, Gremberg L, Shapira Y, Douvdevani A, Gelam S. Raised interleukin-6 levels in obese patients. *Obes Res* 2000; 8: 673-675.

Rubinstein I, Zamel N, DuBarry L, Hoffstein V. Airflow limitation in morbidly obese, nonsmoking men. *Ann Intern Med* 1990; 112: 828-832.

Rutten EPA, Franssen FME, Engelen MPKJ, Wouters EFM, Deutz NEP, Schols AMWJ. Greater whole-body myofibrillar protein breakdown in cachectic patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 829-834.

Ryan CM, Bradley TD. Pathogenesis of obstructive sleep apnea. *J Appl Physiol* 2005; 99: 2440-2445.

Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* 2005; 112: 2660-2667.

Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Predictors of elevated Nuclear Factor-kB-dependent genes in obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 824-830.

Saey D, Michaud A, Couillard A, Côté CH, Mador MJ, LeBlanc P, Jobin J, Maltais F. Contractile Fatigue, Muscle Morphometry, and Blood Lactate in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 1109-1115.

Sánchez J, Derenne JP, Debesse B, Riquet M, Monod H. Typology of the respiratory muscles in normal men and in patients with moderate chronic respiratory disease. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1982; 18: 901-914.

Sánchez J, Medrano G, Debesse B, Riquet M, Derenne JP. Muscle fibre types in costal and crural diaphragm in normal men and in patients with moderate chronic respiratory disease. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1985; 21: 351-356.

Sánchez J, Brunet A, Medrano G, Debesse B, Derenne JP. Metabolic enzymatic activities in the intercostal and serratus muscles and in the latissimus dorsi of middle-aged normal men and patients with moderate obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1988; 1: 376-383.

Sanders MH, Newman AB, Haggerty CL, Redline S, Lebowitz M, Samet J, O'Connor GT, Punjabi NM, Shahar E. Sleep and sleep-disordered breathing in adults with predominantly mild obstructive airway disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 7-14.

Sauleda J. Correlaciones entre la estructura de los músculos respiratorios y la función respiratoria. (*Tesi Doctoral*). Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 1994.

Sauleda J, Gea J, Orozco-Leví M, Corominas J, Minguella J, Aguar MC, Broquetas JM, Agustí AGN. Structure and function relationships of the respiratory muscles. *Eur Respir J* 1998; 11: 906-911.

Sauleda J, García-Palmer FJ, Tarraga S, Maimó A, Palou A, Agustí AGN. Skeletal muscle changes in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. *Respiratory Medicine* 2003; 97, 804-810.

Schiaffino S and Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* 1996; 76: 371-423.

Schmidt-Weber CB, Akdis M, Akdis CA. Th17 cells in the big picture of immunology. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 247-254.

Schols AMWJ, Creutzberg EC, Buurman WA, Campfield LA, Saris WHM, Wouters EFM. Plasma leptin is related to proinflammatory status and dietary intake in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1220-1226.

Sekosan M, Zakkar M, Wenig BL, Olopade CO, Rubinstein I. Inflammation in the uvula mucosa in patients with obstructive sleep apnea. *Laryngoscope* 1996; 106: 1018-1020.

Sen R, Baltimore D. Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a post-translational mechanism. *Cell* 1986; 47: 921-928.

Series FJ, Simoneau SA, St. Pierre S, Marc I. Characteristics of the genioglossus and musculus uvulae in sleep apnea hypopnea syndrome and in snorers. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1870-1874.

Shamsuzzaman ASM, Winnicki M, Lanfranchi P, Wolk R, Kara T, Accurso, Somers VK. Elevated C-Reactive Protein in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* 2002; 105: 2462-2464.

Shepherd KL, Jensen CM, Maddison KJ, Hillman DR, Eastwood PR. Relationship between upper airway and inspiratory pump muscle force in obstructive sleep apnea. *Chest* 2006; 130: 1757-1764.

Shore SA. Obesity, airway hyperresponsiveness, and inflammation. *J Appl Physiol* 2010; 108: 735-743.

Sin DD, Reid WD. Is inflammation good, bad or irrelevant for skeletal muscles in COPD? *Thorax* 2008; 63: 95-96.

Soares SMTP, Oliveira RARA, Franca SA, Rezende SM, Dragosavac D, Kacmarek RM, Carvalho CRR. Continuous positive airway pressure increases inspiratory capacity of COPD patients. *Respirology* 2008; 13: 387-393.

Sobradillo V, Miravittles M, Jiménez CA, Gabriel R, Viejo JL, Masa JF, et al. Estudio epidemiológico de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica en España (IBEREPOC): prevalencia de síntomas respiratorios habituales y de limitación crónica al flujo aéreo. *Arch Bronconeumol* 1999; 35: 159-166.

Soriano JB, Miravittles M. Datos epidemiológicos de EPOC en España. *Arch Bronconeumol* 2007; 43 Supl 1: 2-9.

Standring S, Ellis H, Healy JC, Johnson D, Williams A. *Gray's Anatomy*, 39th Edition. London. Elsevier, 2005: pp 961-964 i 1084-1086.

Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Moller K, Pedersen BK. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: E433-E437.

Steiropoulos P, Tsara V, Nena E, Fiteli C, Kataropoulou M, Froudarakis M, Christaki P, Bouros D. Effect of continuous positive airway pressure treatment on serum cardiovascular risk factors in patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Chest* 2007; 132: 843-851.

Steiropoulos P, Kotsianidis I, Nena E, Tsara V, Gounari E, Hatzizisi O, Kyriazis G, Christaki P, Froudarakis M, Bouros D. Long-term effect of continuous positive airway pressure therapy on inflammation markers of patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep* 2009; 32: 537-543.

Stern LZ, Payne CM, Gruener R, Anderson RM, Hannapel LK. Intercostal muscle biopsy in human neuromuscular disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1975; 38: 900-910.

Stevens L, Bastide B, Mounier Y. En Bottinelli, R and Reggiani, C. (eds). *Skeletal muscle plasticity in health and disease*. Dordrecht, The Netherlands. Springer, 2006: pp 213-264.

Stradling J. Obstructive sleep apnoea. Trials are under way to determine the still unclear associations between sleep apnea and cardiovascular outcomes. *BMJ* 2007; 335: 313-314.

Sullivan CE, Issa FG, Berthon-Jones M. Reversal of obstructive sleep apnea by continuous positive airway pressure applied through the nares. *Lancet* 1981; i: 862-864.

Taheri S, Austin D, Lin L, Nieto FJ, Young T, Mignot E. Correlates of serum C-Reactive Protein (CRP) No association with sleep duration or sleep-disordered breathing. *Sleep* 2007; 30: 991-996.

Takabatake N, Nakamura H, Abe S, Hino T, Saito H, Yuki H, Kato S, Tomoike H. Circulating leptin in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1215-1219.

Takabatake N, Nakamura H, Abe S, Inoue S, Hino T, Saito H, Yuki H, Kato S, Tomoike H. The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor-alpha system in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1179-1184.

Tanner CJ, Barakat HA, Dohm GL, Pories WJ, MacDonald KG, Cunningham PR, Swanson MS, Houmard JA. Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282: E1191-E1196.

Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: R345-R353.

Tomiya A, Aizawa T, Nagatomi R, Sensui H, Kokubun S. Myofibers express IL-6 after eccentric exercise. *Am J Sports Med* 2004; 32: 503-508.

Tusiewicz K, Moldovsky H, Bryan AC, Bryan MH. Mechanics of the ribcage and diaphragm during sleep. *J Appl Physiol* 1977; 43: 600-602.

Van Dielen FM, van Veer C, Schols AM, Soeters PB, Buurman WA, Greve JW. Increased leptin concentrations correlate with increased concentrations of inflammatory markers in morbidly obese individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25: 1759-1766.

Vanuxem D, Badier M, Guillot C, Delpierre S, Jahjah F, Vanuxem P. Impairment of muscle energy metabolism in patients with sleep apnoea syndrome. *Respir Med* 1997; 91: 551-557.

Vassilakopoulos T, Divangahi M, Rallis G, Kishta O, Petrof B, Comtois A, Hussain SNA. Differential cytokine gene expression in the diaphragm in response to strenuous resistive breathing. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 154-161.

Verin E, Tardif C, Portier F, Similowski T, Pasquis P, Muir JF. Evidence for expiratory flow limitation of extrathoracic origin in patients with obstructive sleep apnoea. *Thorax* 2002; 57: 423-428.

Vernooy JHJ, Drummen NEA, Van Suylen RJ, Cloots RHE, Möller GM, Bracke KR, Zuyderduyn S, Dentener MA, Brusselle GG, Hiemstra PS, Wouters EFM. Enhanced pulmonary leptin expression in patients with severe COPD and asymptomatic smokers. *Thorax* 2009; 64: 26-32.

Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Hopper K, Lotsikas A, Lin HM, Kales A, Chrousos GP. Sleep apnea and daytime sleepiness and fatigue: relation to visceral obesity, insulin resistance, and hypercytokinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 1151-1158.

Vgontzas AN, Zoumakis E, Lin HM, Bixler EO, Trakada G, Chrousos GP. Marked decrease in sleepiness in patients with sleep apnea by etanercept, a tumor necrosis factor-alpha antagonist. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 4409-4413.

Vincken W, Guilleminault C, Silvestri L, Cosio M, Grassino A. Inspiratory muscle activity as a trigger causing the airways to open in obstructive sleep apnea. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 372-377.

Vlahakis NE, Schroeder MA, Limper AH, Hubmayr RD. Stretch induces cytokine release by alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol* 1999; 277: L167-L173.

Vogelmeier C, Hederer B, Glaab T, Schmidt H, Rutten-van Mülken MPM, Beeh KM, Rabe KF, Fabbri LM, for the POET-COPD Investigators. Tiotropium versus salmeterol for the prevention of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2011; 364: 1093-1103.

Wang H, Parker JD, Newton GE, Floras JS, Mak S, Chiu KL, Ruttanaumpawan P, Tomlinson G, Bradley TD. Influence of obstructive sleep apnea on mortality in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 1625-1631.

Wang Z, Nakayama T. Inflammation, a link between obesity and cardiovascular disease. *Mediators Inflamm* 2010; vol 2010, Article ID 535918. doi:10.1155/2010/535918.

Warren GL, Hulderman T, Jensen N, McKinstry M, Mishra M, Luster MI, Simeonova PP. Physiological role of tumor necrosis factor alpha in traumatic muscle injury. *FASEB J* 2002; 16: 1630-1632.

Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: An effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006; 24: 677-688.

Weiner P, Waizman J, Weiner M, Rabner M, Magadle R, Zamir D. Influence of excessive weight loss after gastroplasty for morbid obesity on respiratory muscle performance. *Thorax* 1998; 53: 39-42.

Weitzenblum E, Chaouat A. Sleep and chronic obstructive pulmonary disease. *Sleep Med Rev* 2004; 8: 281-294.

Weitzenblum E, Chaouat A, Kessler R, Canuet M. Overlap syndrome. Obstructive sleep apnea in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5: 237-241.

White DP. Sleep Apnea. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 124-128.

Wilcox PG, Paré PD, Road JD, Fleetham JA. Respiratory muscle function during obstructive sleep apnea. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 533-539.

Wilcox PG, Wakai Y, Walley KR, Cooper DJ, Road J. Tumor necrosis factor alpha decreases *in vivo* diaphragm contractility in dogs. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 1368-1373.

Wilson TA, Legrand A, Gevenois PA, De Troyer A. Respiratory effects of the external and internal intercostal muscles in humans. *J Physiol* 2001; 530: 319-330.

Woodson BT, Garancis JC, Toohill RJ. Histopathologic changes in snoring and obstructive sleep apnea syndrome. *Laryngoscope* 1991; 101 (12 Pt 1): 1318-1322.

World Health Organization. Obesity and overweight. Fact Sheet No311. September 2006. <http://www.who.int/mediacenter/factsheets/fs311/en/index.html>.

Wouters EF, Creutzberg EC, Schols AM. Systemic effects in COPD. *Chest* 2002; 121: 127S-130S.

Wulster-Radcliffe MC, Ajuwon KM, Wang J, Christian JA, Spurlock ME. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316: 924-929.

Yamauchi M, Tamaki S, Tomoda K, Yoshikawa M, Fukuoka A, Makinodan K, Koyama N, Suzuki T, Kimura H. Evidence for activation of nuclear factor kappaB in obstructive sleep apnea. *Sleep Breath* 2006; 10: 189-193.

Yee BJ, Cheung J, Phipps P, Banerjee D, Piper AJ, Grunstein RR. Treatment of Obesity Hypoventilation Syndrome and Serum Leptin. *Respiration* 2006; 73: 209-212.

Yende S, Waterer GW, Tolley EA, Newman AB, Bauer DC, Taaffe DR, Jensen R, Crapo R, et al. Inflammatory markers are associated with ventilatory limitation and muscle dysfunction in obstructive lung disease in well functioning elderly subjects. *Thorax* 2006; 61: 10-16.

Yokoe T, Minoguchi K, Matsuo H, Oda N, Minoguchi H, Yoshino G, Hirano T, Adachi M. Elevated levels of C-Reactive Protein and Interleukin-6 in patients with obstructive sleep apnea syndrome are decreased by nasal continuous positive airway pressure. *Circulation* 2003; 107: 1129-1134.

York DA, Rössner S, Caterson I, Chen CM, James WPT, Kumanyika S, Martorell R, Vorster HH. Obesity, a worldwide epidemic related to heart disease and stroke. Group I: Worldwide demographics of obesity. *Circulation* 2004; 110: e463-e470.

Young B, Heath JW. *Wheater's: Histología Funcional*, 4ª Edición. Madrid. Harcourt, 2001: pp 46-64.

Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med* 1993; 328: 1230-1235.

Young T, Peppard PE, Gottlieb DJ. Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1217-1239.

Yun AJ, Lee PY, Bazar KA. Autonomic dysregulation as a basis of cardiovascular disturbances associated with obstructive sleep apnoea and other conditions of chronic hypoxia, hypercapnia and acidosis. *Med Hypothesis* 2004; 62: 852-856.

Zeng L, Akasaki Y, Sato K, Ouchi N, Izumiya Y, Walsh K. Insulin-like 6 is induced by muscle injury and functions as a regenerative factor. *J Biol Chem* 2010; 285: 36060-36069.

Zhu E, Petrof B, Gea J, Comtois N, Grassino A. Diaphragm muscle fiber injury following inspiratory resistive breathing. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1110-1116.

