

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA.

**EFFECTOS DE LA RESPIRACIÓN BAJO CARGAS
MODERADAS SOBRE EL MÚSCULO
ESQUELÉTICO. DAÑO, INFLAMACIÓN Y
REMODELAMIENTO.**

Tesis para acceder al grado de Doctor en Ciencias de la Universidad
Autónoma de Barcelona.
(Programa de Biología Celular)

José Ramón Palacio Cornide

**Codirectores: Dr. Joaquín Gea Guiral
Dra. Paz Martínez Ramírez**

Barcelona, 2001

**Nada te turbe,
Nada te espante,
Todo se pasa.**

.....

Teresa de Cepeda y Ahumada
(Ávila, 1515 - 1582)

**A mis padres.
A Lázaro, Regla y Mercedes.
A Margarita y María Teresa del Valle.
A Jana y Andrea,
por supuesto.**

NOTA PRELIMINAR.

Los resultados preliminares de esta tesis se han publicado en forma de resúmenes en :

- Palacio J., Galdiz JB., Mariñán M., Orozco-Levi M., Martínez P., Bech JJ. y Gea J. Cellular damage and expresión of Il-10 and TNF- in skeletal muscles following resistive inspiratory breathing. Am J Respir Crit Care Med 2001; 163: A147.
- Gáldiz JB., Palacio J., Álvarez FJ., Mariñán M., Orozco-Levi M. y Gea J. Evaluación del daño de membrana en las fibras musculares: marcadores biológicos frente a técnicas estándar. Arch de Bronconeumol 2001; 37: 42.
- Gáldiz JB., Palacio J., Mariñán M., Orozco-Levi M., Martínez P., Bech JJ. y Gea J. Daño celular y expresión de la interleucina 10 (IL-10) y el factor de necrosis tumoral (TNF-) en los músculos esqueléticos tras respiración bajo resistencias inspiratorias. Arch. Bronconeumol 2001;3: 17.
- Palacio J., Gáldiz JB., Hernández-Frutos N., Mariñán M., Orozco-Levi M., Gea J. y Broquetas JM. Canvis induïts en la estructura muscular per càrregues inspiratòries cròniques de baixa intensitat en un model animal. Ann Med 2000; 83: S14
- Hernández N., Gáldiz JB., Palacio J., Mariñán M., Orozco-Levi M., Gea J. y Broquetas JM. Cambios inducidos en la estructura muscular por cargas inspiratorias crónicas de baja intensidad en un modelo animal. VII Symposium sobre Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, Barcelona. Libro de resúmenes 2000; 106.
- Gáldiz JB., Palacio J., Mariñán M., Hernández N., Rumbero JC. y Campo A. Características fibrilares de los músculos respiratorios en perros (Beagle). Arch Bronconeumol 1999; 35: 28.

Parte de los resultados de este trabajo han dado lugar a tres artículos científicos:

Palacio J., Gáldiz JB., Álvarez FJ., Orozco-Levi M., Lloreta J. y Gea J. The Procion orange tracer dye technique *versus* identification of intrafibrillar fibronectin in the assessment of sarcolemmal damage. Enviado a publicar en Eur J Clin Invest.

Gáldiz JB., Palacio J., Alvarez FJ., Hernández N., Mariñán M. y Gea J. Estructura básica de los músculos respiratorios y periféricos en el perro Beagle. Enviado a publicar en Arch Bronconeumol.

Palacio J., Gáldiz JB., Bech JJ., Mariñán M., Casadevall C., Martínez P y Gea J. Expresión de los genes codificadores de la interleucina 10 (IL-10) y Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-) en los músculos respiratorios y periféricos. Relación con el daño sarcolémico. Enviado a publicar en Arch Bronconeumol.

AYUDAS Y SUBVENCIONES:

Este trabajo ha sido financiado por varios organismos nacionales y europeos:

Ayuda otorgada por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS): *“Expresión de los genes codificadores de las formas lenta y rápida de miosina en músculos respiratorios de sujetos con función pulmonar normal.”* Ref. 96/0720.

Ayuda otorgada por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS): *“Daño celular en los músculos respiratorios de seres humanos: “Asociaciones con la presencia de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica y con la Adaptación Muscular (entrenamiento).”* Ref. 00/0550E.

Ayuda europea **“ERESMUS in COPD”** *European network for study of clinical and biological implications of respiratory muscle failure in patients with chronic obstructive pulmonary disease* (Ref. BMH4-CT98-3406).

Ayuda europea **“PENAM”** *European network for ageing muscle and associated diseases. V Programa Marco D.G. XII* (Ref. QLRT-2000-00417).

ANOTACIONES GENERALES.

1. Con el fin de facilitar el seguimiento y la lectura del manuscrito de la tesis doctoral, las referencias bibliográficas de esta tesis se han indicado en el texto mediante el nombre del primer autor y el año de su publicación. Dichas referencias están especificadas por orden alfabético y según las normas de *Vancouver* en el apartado de Bibliografía.
2. En la mayoría de los casos los datos reflejados en las tablas también se han representado en forma de histograma (figuras). El objetivo de esta aparente duplicidad es facilitar la interpretación de los resultados al lector-revisor.

AGRADECIMIENTOS.

Cuando piensas que lo has terminado todo, que lo has escrito todo, que lo has corregido todo. Cuando piensas que has terminado de numerar y renumerar las tablas y los gráficos mil veces. Y cuando te parece que no te queda nada por hacer, aún, te quedan por escribir los Agradecimientos. Estos párrafos que dejamos para el final, y sin embargo, son los que todo el mundo se lee primero. Para mí, realmente son muy importantes, sólo el que emigra sabe bien todo lo que tiene que agradecer cuando se comienza a caminar a destiempo, por un camino desconocido. Y como no quiero que se me olvide nadie, ante todo, Gracias.

Quiero agradecer a mis codirectores de tesis Dr. Joaquín Gea y Dra. Paz Martínez, todo el tiempo que han dedicado al diseño de esta investigación, a mi formación como investigador y al desarrollo de esta tesis. Sus sugerencias han sido fundamentales para que este trabajo hoy pueda ser leído.

Deseo agradecer al Dr. Galdiz y a su grupo de colaboradores del Servicio de Neumología del Hospital de Cruces, Universidad del País Vasco, todo el apoyo brindado y haber desarrollado con éxito el modelo experimental en perros, sin el cual hubiera sido imposible este trabajo.

Sería imposible dejar de mencionar todo mi agradecimiento a la Dra. María Antonieta Pelegrino y a los colaboradores del laboratorio del Dr. Reiaggni de la Universidad de Pavia por el apoyo recibido. En igual medida, quiero agradecer a mis colegas Juanjo Bech, David Botello, Dra. Marta Vives, Paqui García y Dr. Toni Iborra del Instituto de Biotecnología y Biomedicina "Vicent Villar i Palas" de la Universidad Autónoma de Barcelona todo el apoyo y ayuda brindada en el desarrollo de este trabajo.

Quiero dejar patente mi agradecimiento a todo el personal del Servicio de Neumología del Hospital del Mar, y muy especialmente a su Jefe de Servicio el Dr. J.M. Broquetas por todo el apoyo recibido durante estos años como becario en el Servicio. Aquí sería imposible dejar de mencionar a la Srta. Roser Pedreny, que con sólo mirarnos va indicándonos el camino, y de esta forma nos hace más fáciles de sortear los miles de obstáculos que a diario se presentan. Al Dr. Miguel Félez, mi médico de cabecera, y quien siempre me salva en todos los problemas informáticos, a la Dra. Esther Barreiro que me enseñó todos los entresijos para recoger

correctamente las muestras de músculo, al Dr. Minguella que se empeña siempre en que me acerque a la mesa del quirófano, pero no lo consigue, a las enfermeras Nuria Soler y Ángela Roig por todo el apoyo que nos brindan a diario.

Agradezco al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital del Mar y muy especialmente a los doctores Dr. Corominas, Dr. Lloreta, Dra. Luisa Mariñoso y a la Lda. Teresa Baró todo el apoyo, los conocimientos y la ayuda que me brindaron cuando tuve que “descubrir” el músculo esquelético. De igual forma, agradezco la colaboración que he recibido en todo momento de Angela Ojeda, Yolanda Nuñez, Pilar García y María García en el desarrollo de nuestro trabajo.

Deseo agradecer a mis compañeros del IMIM y muy especialmente a la Dra. Olga Pol y al Dr. José María Torres, la colaboración y ayuda que siempre he encontrado en sus respectivos laboratorios. A mis compañeros “machacas” Ana Enjuanes, Olga López, Yolanda Morera, Eli Engel, Natalia Jiménez, Víctor Fernández y Luis Valle, con quienes he compartido a diario las ilusiones y las desilusiones de la investigación, y también porque no, en los muchos momentos de cafés, risas y esparcimiento, en ellos siempre he encontrado, aliento, ayuda y apoyo. Sería imposible dejar de mencionar a Teresa Jimenez y Maruja Veny, así como a todas las auxiliares del IMIM quienes con su hacer diario y responsable en los laboratorios me han llenado siempre de respeto y admiración hacia ellas.

Quiero agradecer a mis compañeros y amigos del ICBP “Victoria de Girón” y del Hospital Gineco-Obstétrico “Eusebio Hernández” de la Habana, de donde soy, de donde me formé, por todo el apoyo recibido. Muy especialmente quiero hacer patente mi gratitud al Dr. José Ramón Molina y al Dr. Raúl Fernández Regalado que han sido siempre mis profesores.

A mis familiares y amigos, a aquellos que siempre les he dado la lata explicándoles si los perros se mueren, si la electroforesis no sale, si la miosina no aumenta, en fin ... todo. A Jesús Palacio, Dolores Lázaro, Xavi Serra, Marc Antoni Martí, Cristina Marino, María Rivas, Cristina Templado, Julia Lorenzo, Julia Molina, Chelo Vallejo, Carmen Trincado, Orlando Ruiz, Valentina González, Isabel Cabrales, Josefa Cardero, Luis Frades, Rafael Fernández, Roger Socarrás, Eduardo Zarza, Antonio Morera, Mayra Garí, Rafael Jiménez, Lily Marín, Ela Sepúlveda, Silvana Sánchez, María Elena Díaz, Giovanni Gómez, Vivian Sánchez, Ivan Esteva, Ana Cabrera, Carmen Migdalia García, Iris Pineda, Miriam Oquendo, Marta Váldez-Dapena, Amable Téllez, Fernando López, Mary

Nieves Díaz, Ileana Hurtado, Armando Molina, Miriam Oquendo, Milagros Abejón, María del Carmen Morales; y como no, a la Tita Isabel que cada domingo me hace una comida que me da fuerzas para trabajar la semana siguiente.

Por último y no menos importante deseo expresar mi más profundo agradecimiento a mis compañeras de laboratorio Dra. Carme Casadevall quien tuvo la dedicación de revisar meticulosamente mis primeros manuscritos, y con mucha paciencia me ayudó a convertir mi "spanish-americano", barroco y complicado, en un castellano más peninsular, sencillo y fluido; a Dolors Moyes y a Nuria Hernández que me han ayudado día a día a que este trabajo salga siempre adelante, a que nada sea imposible y aún más, a ser más que colegas amigos.

A todos, MUCHAS GRACIAS.

PRINCIPALES ABREVIATURAS.

RT-PCR	Técnica de transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.
ELISA	Técnica colorimétrica de detección inmunoenzimática.
NADH	Adenosin Nicotinamida Dinucleótido Reductasa.
PAS	Reacción del ácido periódico frente al reactivo de Schiff.
SDH	Succinato deshidrogenasa.
MyHC	Isoforma de cadena pesada de miosina.
MyLC	Isoforma de cadena ligera de miosina
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
IL	Interleucina.
TNF	Factor de necrosis tumoral.
IFN	Interferón.
IGF	Factor de crecimiento de insulina.
O.C.T.	Ornitil Carbamil Transferasa.
APES	3-aminopropiltriétoxilano 99%.
BSA	Albúmina de suero bovino.
PBS	Tampón Fosfato-Salino, pH 7,4.
DAB	3-3'diaminobenzidina.
DMAB	ácido 3-dimetilaminobenzoico.
MBTH	Hidroclorido 3-metil-2-benzotiazolina hidrazona.
LPS	Lipopolisacárido.
F_R	Frecuencia respiratoria.
V_T	Volumen corriente.
T_I	Tiempo inspiratorio.
T_{TOT}	Tiempo total respiratorio.
R_i	Resistencia inspiratoria
W_R	Trabajo respiratorio total
V_I pico	Flujo inspiratorio en pico.
PT	Presión Traqueal.
Raw	Resistencia de las vías aéreas.
PIM	Presión inspiratoria máxima.

NOTA PRELIMINAR.	ii
AYUDAS Y SUBVENCIONES.	iv
ANOTACIONES GENERALES.	v
AGRADECIMIENTOS.	vi
PRINCIPALES ABREVIATURAS.	ix

ÍNDICE

I- INTRODUCCIÓN.	1
1,1- ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL TEJIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO.	2
1,1,1- Estructura básica de los músculos esqueléticos.	2
1,1,2- Estructura básica de la fibra muscular.	2
1,1,3- Ultraestructura de la fibra muscular estriada.	5
a. Sarcolema o membrana celular.	5
b. Miofibrillas.	5
c. Otros componentes subcelulares.	6
1,2- DIFERENTES FORMAS DE CLASIFICAR LOS TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES.	6
1,3- PAPEL DE LA MIOSINA EN LA CONTRACCIÓN MUSCULAR.	11
1,4- ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LOS MÚSCULOS RESPIRATORIOS.	13
1,5- MODELOS EXPERIMENTALES EN ANIMALES.	14
1,6- DAÑO DE MEMBRANA CITOPLASMÁTICA.	16
1,7- EXPRESIÓN DE LAS CITOCINAS TNF- Y IL-10 INDUCIDAS POR LA APLICACIÓN DE CARGAS.	19
1,7,1- Estudios que analizan la expresión de las citocinas en pacientes con enfermedades obstructivas respiratorias.	20

1,7,2-	Estudios que analizan la expresión de citocinas, y los mecanismos de función e interrelación fisiológica en el músculo esquelético.	22
1,8-	LA REMODELACIÓN MUSCULAR.	25
1,8,1-	Cambios estructurales en los músculos respiratorios ocasionados por la EPOC.	27
	a) A nivel celular.	27
	b) A nivel subcelular.	28
	c) A nivel molecular.	29
	d) A nivel transcripcional de las isoformas de MyHC.	30
II-	HIPÓTESIS.	31
III-	OBJETIVOS.	33
IV-	MATERIALES Y MÉTODOS.	35
4,1-	CONSIDERACIONES GENERALES.	36
4,2-	ESTUDIO 1: VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE DETECCIÓN DE FIBRONECTINA INTRACELULAR, EN LA EVALUACIÓN DEL DAÑO DE MEMBRANA.	38
4,2,1-	Población.	38
4,2,2-	Biopsias del estudio.	38
4,2,3-	Protocolo para provocar daño de membrana en ratones.	38
4,2,4-	Procesamiento de las muestras.	38
4,2,5-	Técnica inmunohistoquímica para la detección de fibronectina intracelular.	40
4,2,6-	Técnica para determinar la presencia del colorante <i>Procion orange</i> intracelular.	42
4,3-	ESTUDIO 2: MODELO EXPERIMENTAL CANINO PARA LA OBSTRUCCIÓN AL FLUJO AÉREO, CON LA APLICACIÓN DE CARGAS INSPIRATORIAS RESISTIVAS.	44

4,3,1-	Población, grupo estudio y grupo control.	44
4,3,2-	Esquema general del procedimiento experimental.	44
4,3,3-	Traqueostomía. Protocolo quirúrgico y Obtención de las primeras biopsias (1ª biopsia).	45
4,3,3,1-	Procedimientos para anestesia durante la intervención quirúrgica.	45
4,3,3,2-	Preparación quirúrgica de los animales.	45
4,3,3,3-	Procedimiento quirúrgico. Traqueostomía y toma de las primeras muestras musculares.	45
4,3,4-	Medición de los parámetros respiratorios basales del animal.	47
4,3,5-	Protocolo de cargas inspiratorias resistivas.	48
4,3,6-	Obtención de las segundas biopsias.	50
4,3,7-	Procesamiento de los músculos.	50
4,3,7,1-	Procesamiento de las muestras.	50
4,3,7,2-	Cortes del tejido muscular preservados en parafina. ...	50
4,3,7,3-	Procesamiento de las muestras congeladas para la obtención de un homogeneizado de proteínas totales del tejido.	51
4,4-	TÉCNICAS UTILIZADAS.	51
4,4,1-	Tinción de Hematoxilina de Harris.	51
4,4,2-	Técnicas Inmunohistoquímicas de tinción para la determinación de los tipos de fibras musculares y del daño de membrana celular.	52
4,4,3-	Técnica inmunoenzimática para la semicuantificación de isoformas I y II de cadena pesada de miosina	55
4,4,4-	Técnica de electroforesis para la separación de las isoformas de MyHC en los homogeneizados celulares.	59
4,4,5-	Técnica de inmunotransferencia e inmunodetección de isoformas de cadena pesada de MyHC I y II.	60
4,4,6-	Técnica de transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).	63

4,5-	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	70
	4,5,1- Análisis descriptivo.	70
	4,5,2- Análisis comparativo.	70
	4,5,3- Análisis de las correlaciones y concordancia.	70
4,6-	ASPECTOS ÉTICOS Y JURÍDICOS RELACIONADOS CON ESTE ESTUDIO.	71
V	RESULTADOS.	73
5,1-	RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO 1.	74
	5,1,1- Validación de la técnica de detección de fibronectina intracitoplasmática para determinar daño en la permeabilidad de la membrana fibrilar.	74
5,2-	RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO 2.	77
	5,2,1- Características estructurales basales de las fibras musculares en los músculos intercostal externo, diafragma y vasto interno de perros de la raza Beagle.	77
	5,2,2- Resultados globales de la aplicación de cargas resistivas.	79
	5,2,3- Resultados en los animales con carga.	80
	5,2,4- Estandarización de la técnica inmunohistoquímica para determinar los tipos fibrilares.	80
	5,2,4,1- Especificidad de los anticuerpos anti-isoformas de MyHC utilizados en el estudio.	81
	5,2,4,2- Determinación de los tipos de fibras musculares por inmunohistoquímica.	81
	5,2,5- Tipificación de fibras musculares en el modelo experimental.	82
	5,2,6- Tamaño de las fibras musculares.	89
	5,2,7- Porcentaje relativo y cuantificación de isoformas de MyHC en el tejido muscular.	93
	5,2,8- Daño de membrana en las fibras musculares.	100
	5,2,9- Expresión de TNF- y IL-10 en los músculos estudiados.	100

5,3-	RESUMEN DE LOS CAMBIOS MUSCULARES INDUCIDOS POR LA APLICACIÓN DE CARGAS INSPIRATORIAS RESISTIVAS. ...	106
5,3,1-	Daño de membrana.	106
5,3,2-	Estructura fibrilar.	112
5,3,3-	Expresión de isoformas de MyHC en las fibras musculares.	112
5,3,4-	Expresión de TNF- e IL-10.	113
VI	DISCUSIÓN.	114
6,1-	ESTUDIO 1.- VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE DETECCIÓN DE FIBRONECTINA INTRACELULAR, EN LA EVALUACIÓN DEL DAÑO DE MEMBRANA.....	115
6,2-	ESTUDIO 2.- ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS INDUCIDOS EN LAS FIBRAS MUSCULARES COMO CONSECUENCIA DE LA APLICACIÓN DE CARGAS INSPIRATORIAS RESISTIVAS.	117
6,2,1-	Alteraciones en la permeabilidad de membrana como consecuencia de las cargas inspiratorias resistivas.	119
6,2,2-	Análisis de los cambios morfológicos y en la expresión de proteínas estructurales, en las fibras de los músculos estudiados.	124
6,2,3-	Valoraciones de los cambios obtenidos en las citocinas inflamatoria (TNF-) y anti-inflamatoria (IL-10).	130
VII	CONCLUSIONES.	136
VIII	BIBLIOGRAFÍA.	139