

INTRODUCCIÓN

1,1- ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL TEJIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO.

1,1,1- Estructura básica de los músculos esqueléticos.

Los músculos esqueléticos están constituidos por una unidad básica funcional que se denomina fibra muscular. Las fibras musculares se unen formando grupos o fascículos envueltos por vainas de tejido conectivo. El *perimisio* es la vaina que recubre los fascículos, y el *epimisio* es la vaina que recubre el conjunto de fascículos que constituyen el músculo en su totalidad (Dubowitz, 1985; Bloom y Fawcett, 1996). El drenaje vascular se realiza mediante vasos que discurren por los septos de tejido conectivo, y se ramifican en forma de una red capilar alrededor de cada fibra muscular, aproximadamente tres capilares por fibra.

1,1,2- Estructura básica de la fibra muscular.

La fibra muscular es una célula alargada que puede tener hasta 10 cm de longitud, su forma es cilíndrica y termina en forma de huso. El diámetro de la fibra varía entre 10 y 100 μm . Esta característica indica que existe un enorme polimorfismo celular. Las fibras musculares tienen la peculiaridad de disponerse en forma paralela para constituir los fascículos musculares (Bloom y Fawcett, 1996) (figura 1).

Aparentemente las fibras alcanzan la longitud total del músculo, aunque en la mayoría de los casos, terminan en una porción de tejido conectivo que se continua hasta la zona de inserción o el tendón (Bloom y Fawcett, 1996; Dubowitz, 1985). Un corte histológico transversal y perpendicular a la dirección de las fibras musculares permite observar el contorno poligonal de las fibras, así como la agrupación de las mismas formando los fascículos musculares (figura 2).

A nivel microscópico, las fibras musculares están constituidas por un *sincitio* multinucleado, rodeado por una membrana celular que se denomina sarcolema. El interior de las fibras musculares está constituido por numerosas miofibrillas separadas entre sí por espacios intermiofibrilares, en los que se encuentran el resto de los orgánulos y componentes celulares (Bloom y Fawcett, 1996). Estas miofibrillas son las responsables de la estriación característica de las fibras musculares esqueléticas y es por esta razón que se denominan fibras musculares estriadas.

Las fibras estriadas del músculo esquelético tienen la peculiaridad de ser polinucleadas. La cantidad de núcleos presente en cada fibra es variable y depende de la longitud de la misma. En la mayoría de los mamíferos los núcleos se encuentran situados en la periferia

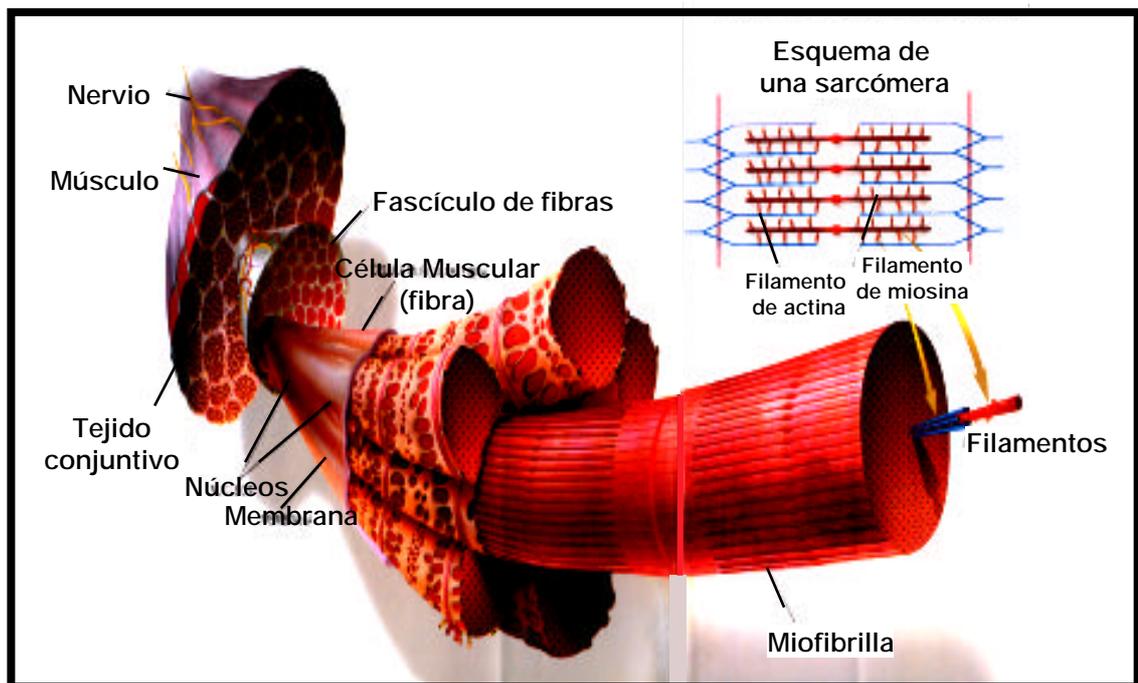
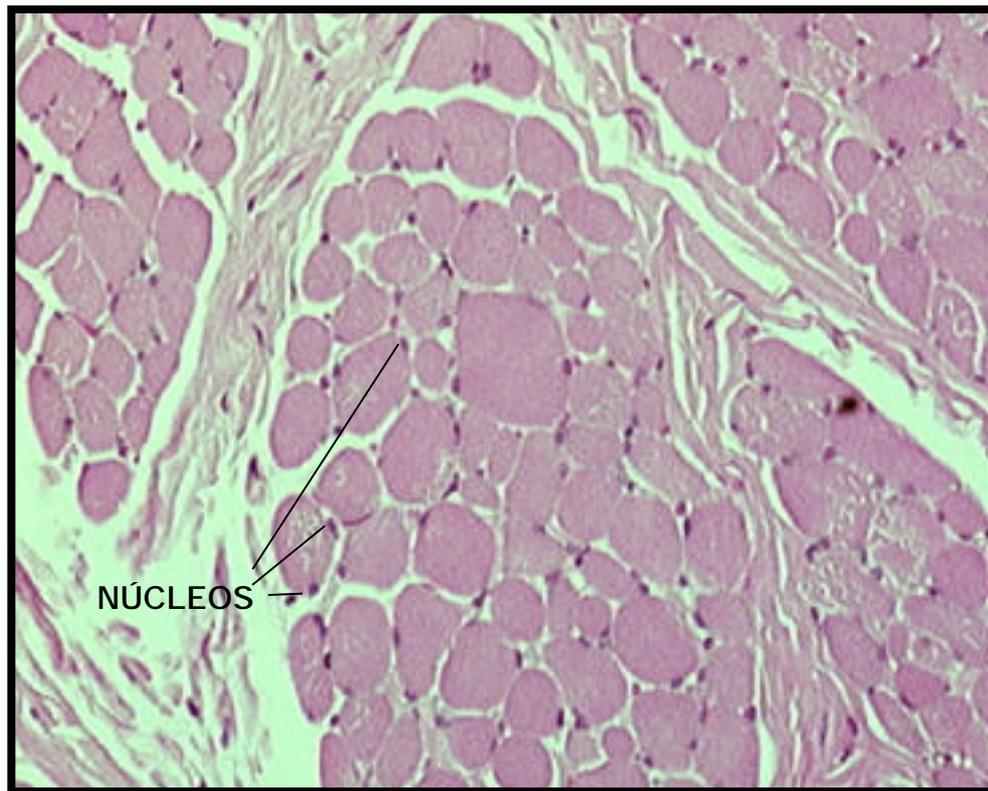


Figura 1. Esquema representativo del músculo esquelético. Imagen tomada de la Revista Investigación y Ciencia. Noviembre 2000 : páginas 6 y 7.



(100x)

Figura 2. Corte transversal de la fibra muscular esquelética. Músculo diafragma, perros de raza **Beagle**. Tinción con Hematoxilina de Harris. Núcleos color intenso en la periferia de las fibras musculares.

celular pegados a la cara interna del sarcolema. Ocasionalmente, sin embargo, pueden encontrarse internalizados en la fibra (Dubowitz, 1985; Bloom y Fawcett, 1996).

1,1,3- Ultraestructura de la fibra muscular estriada.

a. Sarcolema o membrana celular.

La fibra muscular está delimitada por el sarcolema, que es una membrana lipoproteica que forma la cubierta celular. Esta barrera está constituida por dos membranas unidas íntimamente entre sí: la membrana más interna o *plasmalema*, y la más externa o membrana basal. La estructura básica de estas dos membranas sufre modificaciones en las diferentes regiones de la fibra muscular, especialmente en la unión miotendinosa y en la neuromuscular.

El plasmalema es la porción de la membrana celular eléctricamente excitable. Está compuesta por una capa lipídica en la que tienen su punto de anclaje diversas proteínas que conectan con la banda Z de las miofibrillas (Dubowitz, 1985; Bloom y Fawcett, 1996).

La membrana basal constituye la envoltura externa de la fibra muscular y está formada por diversas glicoproteínas que se disponen en dos zonas de distinta densidad, la lámina lúcida o interna y la densa o externa.

b. Miofibrillas.

Las miofibrillas son el componente celular más numeroso y con mayor tamaño de la fibra muscular. Cada una de las miofibrillas está constituida por haces de miofilamentos alineados, que constituyen las sarcómeras. En las sarcómeras, la alternancia proteica determina la apariencia estriada característica de los músculos. Cada sarcómera está constituida por una zona oscura o banda A (anisotrópica) flanqueada por dos zonas claras o bandas I (isotrópicas). La banda A presenta una línea densa central, la línea M, que se encuentra limitada por la franja más pálida o zona H. Los filamentos de la zona I confluyen en el centro de ésta, dando lugar a una línea oscura central denominada línea Z.

La banda A esta formada por filamentos de miosina. La miosina es la proteína estructural más abundante de la miofibrilla. La región en la que se superponen las cadenas de miosinas corresponde a la zona H, mientras que la banda M corresponde a los puentes de unión entre los diferentes apéndices de miosina. La longitud de la banda A permanece constante durante la contracción, aunque se han demostrado cambios en la forma de los apéndices de miosina durante la misma (Wakabayashi, 1992).

La banda I está constituida por filamentos. Estos filamentos están formados por polímeros de la proteína actina dispuestos en forma de doble hélice. Entre los polímeros de actina se dispone una hélice de troponina a la que se fijan complejos de troponina globular a intervalos regulares (Dooth y Perry, 1979). La interconexión entre los filamentos de actina se realiza mediante polímeros de la proteína desmina localizados en la periferia de la línea Z (Dooth y Perry, 1979). Estos filamentos de desmina por su extremo libre se entrecruzan con los filamentos de miosina de la banda A. La longitud de la Banda I depende del estado de contracción en que se encuentre el músculo en ese momento (figura 3).

c. Otros componentes subcelulares.

Dentro del espacio intercelular se encuentran gran número de organelos subcelulares que proporcionan, entre otras funciones, el aporte energético, y permiten a la fibra muscular metabolizar los nutrientes.

Las mitocondrias son el organelo regulador del suministro energético. Generalmente tienen una localización hacia la periferia de la fibra. La cantidad de mitocondrias puede variar entre los diferentes tipos de fibras musculares, siendo numerosas en las fibras de tipo I.

El retículo sarcoplásmico es el equivalente al retículo endoplasmático presente en otros tipos celulares. Está formado por una tupida red de microtúbulos que se extienden alrededor de cada miofibrilla. A diferencia de otros tipos de células, en el músculo estriado el retículo sarcoplásmico está bastante desprovisto de ribosomas. Los microtúbulos se disponen de forma horizontal a las bandas A, pero se anastomosan libremente en las bandas H.

Las vacuolas son otro de los orgánulos subcelulares importantes en la fibra muscular. Están formadas generalmente por liposomas o inclusiones de glicógeno, y se encuentran distribuidas entre las miofibrillas, los grupos de mitocondrias y las redes del retículo sarcoplásmico (figura 4).

1,2- DIFERENTES FORMAS DE CLASIFICAR LOS TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES.

La existencia de diferentes tipos de comportamiento funcional de las fibras musculares, así como las diferencias macroscópicas objetivas en distintos grupos musculares han

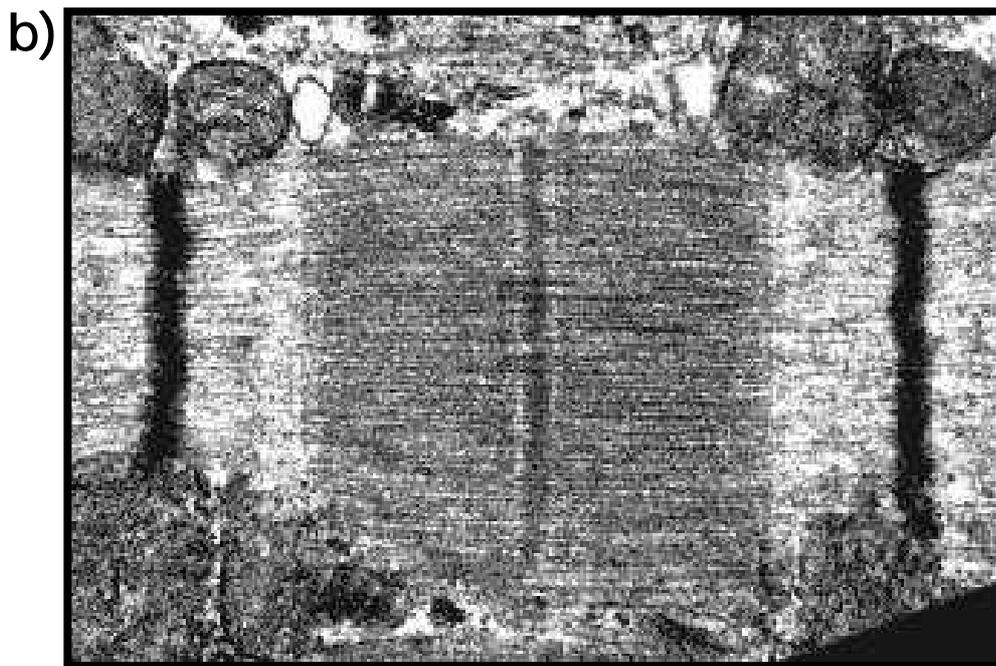
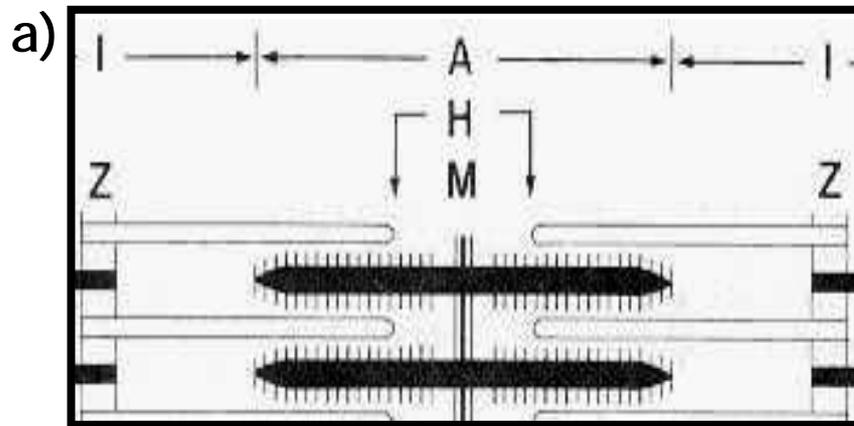


Figura 3. a) Esquema de una sarcómera. b) Microfotografía (M.E., x 20000; 60kV) de músculo estriado. (Esquema tomado de Bloom y Fawcett, 1996).

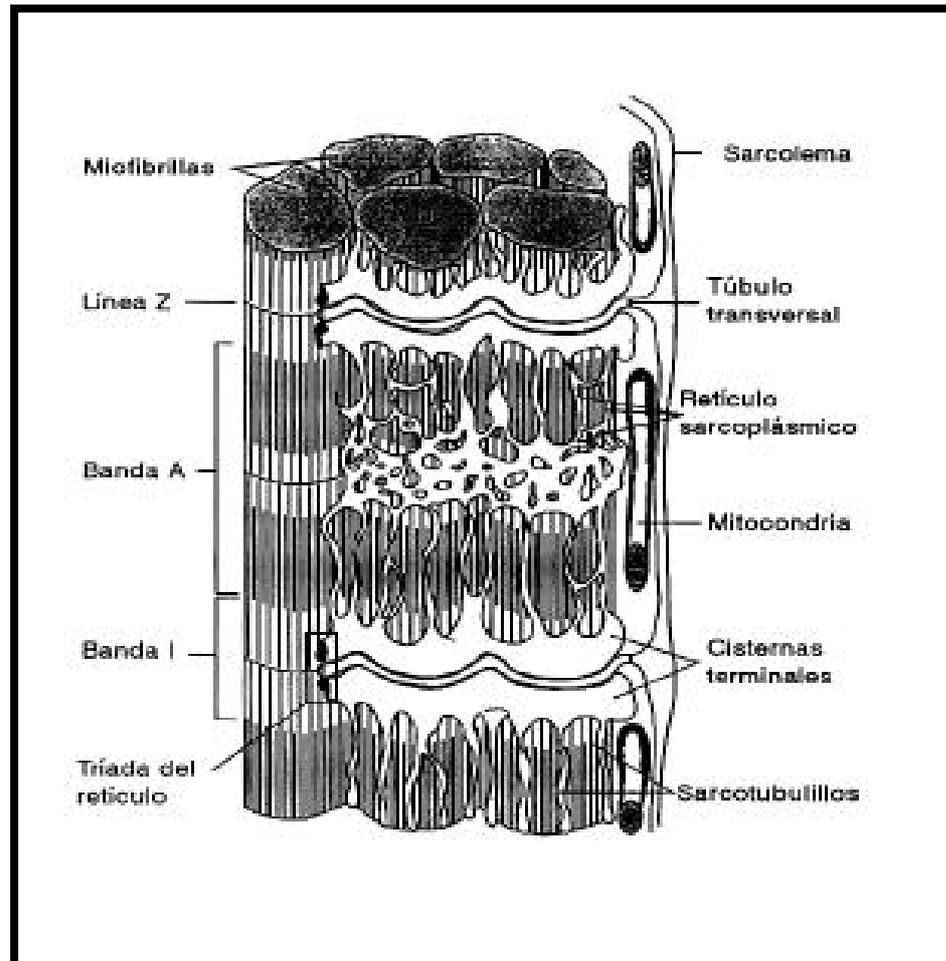


Figura 4. Representación esquemática de la estructura de las fibras musculares (esquema tomado de Bloom y Fawcett 1996). Representación de la estructura microscópica.

determinado, desde finales del siglo XVI, un interés creciente en su conocimiento, clasificación y correlación de estas fibras con la función que desempeñan.

Los anatomistas clásicos describieron, a finales del siglo XIX, la existencia de dos tipos de fibras macroscópicamente diferentes que podían encontrarse formando parte de un mismo músculo. Las fibras fueron clasificadas como: *fibras rojas* que eran delgadas y contenían abundante número de gránulos en su interior, y las *fibras blancas* que eran de mayor tamaño y presentaban menos gránulos.

Posteriormente, con estudios realizados que utilizaban tinciones específicas para lípidos en las fibras musculares se propuso clasificar las fibras musculares en: claras, intermedias y oscuras, atendiendo a los resultados de estas tinciones de lípidos. Por otro lado, se confirmó el hecho de que la proporción y el tamaño de las fibras era variable según el tipo de músculo.

A principios del siglo XX, y con el desarrollo de técnicas específicas de centrifugación, se pudieron localizar distintos sistemas enzimáticos en diferentes fracciones de fibras musculares. De esta forma se comenzó estableciendo una relación entre la actividad biológica y la función de las fibras que se ha mantenido hasta el momento. Posteriormente, el desarrollo de técnicas histoquímicas permitió localizar los sistemas enzimáticos a nivel celular, y además relacionarlos con la actividad funcional de las fibras y su morfología.

En la década de los años 1980, evaluando diversos tipos estructurales de fibras musculares se propuso la clasificación de éstas en dos grandes grupos atendiendo a su actividad contráctil (Schiaffino, 1986). Las fibras musculares se clasificaron en: fibras de contracción lenta (*slow-twitch*) y fibras de contracción rápida (*fast-twitch*). Las fibras lentas tienen la característica de presentar una velocidad de contracción entre 50 y 80 m/seg y se estimulan con facilidad. Por otra parte, las fibras rápidas se estimulan con mayor dificultad. Sin embargo, alcanzan velocidades de contracción superiores, entre 70 y 110 m/seg.

Estudios posteriores en este sentido observaban que la estimulación repetida a bajas frecuencias (10Hz) no inducía la aparición de fatiga en las fibras lentas. Sin embargo, cuando similares estímulos se aplicaban a las fibras rápidas se obtenían dos patrones de comportamiento: mientras algunas fibras eran resistentes a la fatiga, otras la desarrollaban con facilidad (Burke, 1973).

Conjuntamente con estos descubrimientos, el desarrollo de la bioquímica y de las técnicas histoquímicas permitió reconocer los diferentes grados de actividad metabólica que expresan los distintos tipos de fibras musculares. Con ello aparece una nueva clasificación que tiene en cuenta, como criterio fundamental, las características del metabolismo fibrilar.

Atendiendo a estos criterios metabólicos se propuso la siguiente clasificación de las fibras, que ha sido la más usada hasta el momento. Las fibras, según su actividad ATP-asa, se clasificaron en dos tipos. Las fibras tipo I corresponden a aquellas fibras que demuestran una escasa actividad ATP-asa a pH ácido y tienen fundamentalmente un metabolismo oxidativo; las fibras tipo II son aquellas con elevada actividad ATP-asa a pH ácido y tienen un metabolismo fundamentalmente glicolítico (Engel, 1962).

Modificaciones realizadas posteriormente por Brooke y Kaiser (1970) permitieron, realizando variaciones en la alcalinidad del medio de reacción, establecer una subdivisión de las fibras tipo II. De esta forma se subdividieron las fibras tipo II en fibras tipo IIa y IIb. Se denominaron fibras tipo IIa a aquellas que tienen una reacción débil de ATP-asa en cualquier medio ácido (pH 4,2 y 4,6). Y por el contrario, las fibras IIb son las que experimentan una fuerte reacción ATP-asa en medio ácido (pH 4,6) (Brooke y Kaiser, 1970).

La utilización conjunta de otras técnicas histoquímicas como la actividad de adenosin nicotinamida dinucleótido reductasa (NADH), la reacción del ácido periódico frente al reactivo de Shiff (PAS) y determinación de la actividad succinato deshidrogenasa (SDH) ofreció la posibilidad de establecer otras clasificaciones.

Actualmente, junto a las técnicas de actividad enzimática se ha venido abriendo paso la clasificación inmunohistoquímica de las fibras musculares. Esta clasificación tiene como base la utilización de anticuerpos específicos para reconocer los diferentes tipos de isoformas de cadena pesada de la miosina (MyHC) (Schiaffino, 1986).

Estudios realizados por Schiaffino, (1986) con el desarrollo de anticuerpos monoclonales contra las diferentes isoformas de MyHC han permitido establecer una clasificación inmunohistoquímica de las fibras musculares atendiendo a la expresión de la/s isoforma/s de MyHC. Utilizando esta técnica inmunohistoquímica las fibras se pueden clasificar en aquellas que expresan MyHC I, II, IIa, IIb, IIx, MyHC embrionaria y MyHC neonatal; e inclusive se puede determinar si una misma fibra co-expresa dos o más isoformas de MyHC.

Estas fibras que co-expresan más de una isoforma de cadena pesada de miosina se denominan fibras híbridas (Schiaffino, 1990; Schiaffino y Reggiani, 1994, 1996).

Estudios realizados por Sant'Ana Pereira, (1995) en fibras musculares esqueléticas humanas demostraron que existe una correlación entre la clasificación de las fibras por la técnica de ATPasa y la de inmunohistoquímica. Estos autores también llaman la atención sobre las fibras híbridas, que exhiben un gradiente continuo de tinción positiva al ser determinadas por ATPasa. Esta característica hace que no siempre sea posible determinar con exactitud el tipo de fibra. Por esta razón, estos autores destacan que la correlación entre ambas técnicas es más estable cuando las fibras presentan un solo tipo de isoforma de MyHC. Sin embargo, cabe señalar que en muchos casos una fibra no solo comparte más de un tipo de isoforma de MyHC, sino que también puede variar de isoforma de MyHC a lo largo de la misma (Sant'Ana Pereira, 1995). Staron y Johnson (1993) cuando analizaban fibras aisladas de músculo esquelético humano también había referido que algunas fibras presentaban diferentes expresiones de miosina de cadena pesada y encontraban fibras híbridas que contenían conjuntamente MyHC IIa y IIb (Staron y Johnson, 1993; Staron, 1997).

1,3- PAPEL DE LA MIOSINA EN LA CONTRACCIÓN MUSCULAR.

Los filamentos gruesos de las sarcómeras están constituidos fundamentalmente por miosina, aunque pueden también estar presentes otras proteínas, como la titina, la proteína C y la M, que también se unen a la miosina (Schiaffino y Reggiani, 1996). La miosina es una glicoproteína de aproximadamente 200 a 205 KD de peso molecular; y tiene de 15 a 18 nm de diámetro. La molécula de miosina es un hexámero constituido por dos cadenas pesadas (MyHCs), dos cadenas ligeras (MyCLs) esenciales o alcalinas y dos cadenas ligeras reguladoras. Cada una de las cadenas pesadas de miosina está compuesta por una *cabeza* o dominio motor que contiene los sitios de unión con el ATP y la actina, y continua en una larga *cola* helicoidal. La zona de unión de la cabeza a la cola helicoidal se denomina *cuello*. Las cadenas ligeras de miosina están unidas a las cadenas pesadas por la región del cuello de manera tal, que las porciones globulares quedan orientadas hacia la parte exterior de la hélice (Gauthier y Lowey, 1979, Kretsinger, 1992) (figura 5).

En los músculos esqueléticos de los mamíferos se han descrito hasta el momento nueve isoformas de MyHC (Schiaffino y Reggiani, 1996). De estas isoformas las predominantes en el músculo esquelético de mamíferos adultos, en la mayoría de las especies, son cuatro: MyHC I ó /slow, MyHCIIa, MyHCIIx y MyHCIIb. Estudios de las secuencias de aminoácidos

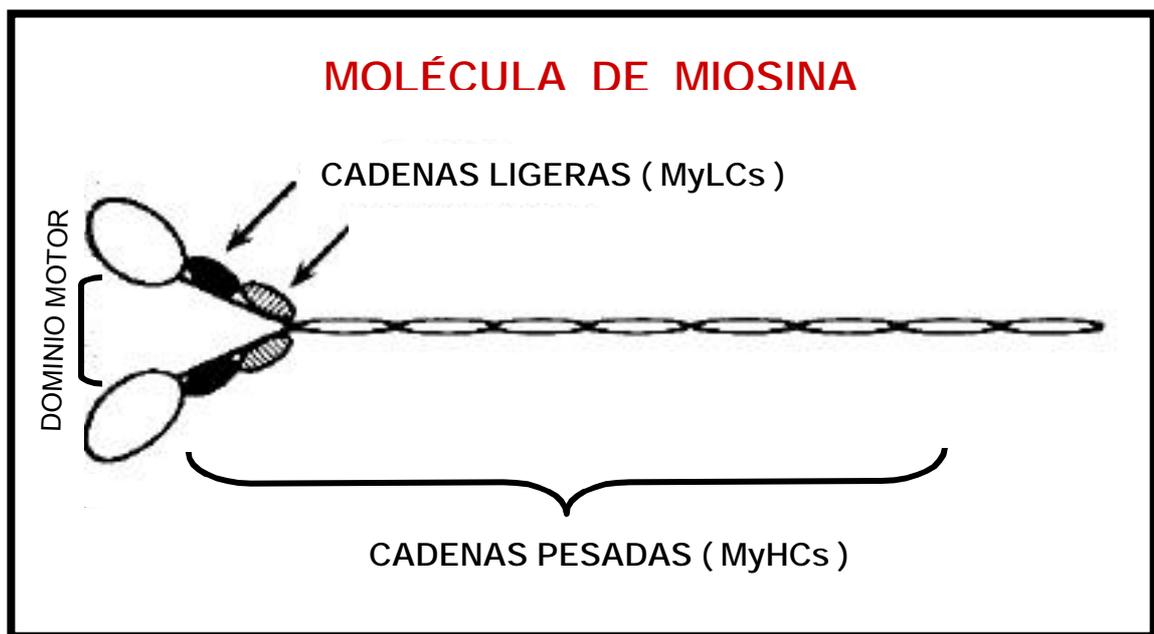


Figura 5. Esquema representativo de la molécula de miosina (MyHC II). Esquema tomado del trabajo científico publicado por Schiaffino y Reggiani *Physiological Reviews* 1996; 76 : 377.

de las isoformas de MyHC presentes en las sarcómeras de los mamíferos han demostrado que entre las mismas hay de un 80% a un 95% de homología, aunque se pueden encontrar variaciones en la secuencia aminoacídica de varias regiones. En muchos casos estas variaciones pueden ser diferencias en la región carboxilo terminal (Schiaffino y Reggiani, 1996; Weiss, 1999).

En el hombre se expresan todos los genes que codifican las isoformas de MyHC, excepto el de la isoforma MyHC IIb. Este gen está presente en el genoma humano pero no se expresa. Las fibras que antiguamente se llamaban de tipo IIb, en humanos, son las que ahora se denominan como de tipo IIx (Smerdu, 1994).

Los dos dominios globulares de la miosina tienen una función motora, y son de gran importancia en la contracción muscular ya que es en esta zona donde se encuentran también los sitios de unión del ATP y los lugares de unión a la actina durante la contracción y el estiramiento del músculo. Es por esto que, en dependencia de la composición diferencial de las isoformas de MyCH que componen el dominio motor, pueden existir variaciones en las características de la contracción muscular; y con ello, diferencias en las características y funciones musculares (Schiaffino y Reggiani, 1996).

Existen dos tipos de MyLCs presentes en la molécula de miosina, las *reguladoras* y las *esenciales*. Ambas pertenecen a una misma superfamilia de proteínas que incluye también la calmodulina y la troponina C (Nakayama y Kretsinger, 1994). En el músculo estriado de los mamíferos se han identificado cinco isoformas de MyLCs esenciales y dos isoformas de MyLCs reguladoras (Schiaffino y Reggiani 1996). No profundizamos más en cuanto al estudio de estas isoformas de cadena ligera por ser ajeno a los propósitos de esta memoria de tesis.

1,4- ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LOS MÚSCULOS RESPIRATORIOS.

Los músculos respiratorios son músculos esqueléticos estriados y su función fundamental consiste en generar el gradiente de presión necesario para la entrada de aire en los pulmones. Esta función es importante y vital para el organismo y, al igual que el músculo cardíaco, no pueden dejar de realizarla durante toda la vida.

En la ventilación ocurren dos procesos concatenados de forma continua, la inspiración y la espiración. Durante la inspiración, la contracción de los músculos inspiratorios hace que se

expanda la cavidad torácica. Este hecho, aumenta la presión negativa en el espacio pleural que rodea los pulmones. Los pulmones, que son órganos muy distensibles, se expanden pasivamente, lo que hace que se haga más negativa la presión en los alvéolos pulmonares. Conforme disminuye la presión alveolar el aire fresco fluye por las vías aéreas hacia los alvéolos hasta que la presión alveolar se iguala a la presión existente en la atmósfera. Durante la espiración, que normalmente se produce de forma pasiva por retracción elástica de los pulmones, se invierte el proceso al relajarse los músculos inspiratorios. Se elevan las presiones pleural y alveolar, y el gas fluye hacia el exterior.

El mecanismo muscular de la inspiración viene dado fundamentalmente por una contracción del músculo diafragma, que se desplaza en dirección caudal hacia la cavidad abdominal. Simultáneamente, hay una contracción de los músculos intercostales externos que tiran de las costillas hacia delante y hacia fuera, acción que produce un incremento del diámetro transversal del tórax.

En los bípedos y en condiciones de reposo la inspiración se produce en las mismas condiciones antes descritas. Sin embargo, en los cuadrúpedos se ha descrito que el movimiento de la locomoción tiene una sincronización con la ventilación del animal (López de Silanes, 1995). La inspiración tiene lugar cuando se extienden las extremidades anteriores y las posteriores precipitan el animal hacia delante. La espiración por el contrario se produce cuando las extremidades anteriores están en contacto con el suelo (López de Silanes, 1995).

Los músculos respiratorios se clasifican en músculos inspiratorios y músculos espiratorios en dependencia del papel que desempeñan durante la ventilación. Los principales músculos inspiratorios en los mamíferos son el diafragma, los paraesternales y los intercostales externos; aunque también pueden actuar de forma auxiliar los músculos intercartilaginosos externos, músculo transversal de las costillas, músculos escalenos y músculo serrato anterior.

1,5- MODELOS EXPERIMENTALES EN ANIMALES.

Los modelos experimentales, que utilizan animales de experimentación, han sido usados ampliamente para tratar de explicar con más o menos acierto muchos de los hallazgos que encontramos en patologías humanas. Estos modelos experimentales utilizados para determinar el daño de membrana celular, la inflamación o los cambios estructurales de las fibras musculares esqueléticas, controlando determinados parámetros, pueden determinar el

o los agentes causales de los mismos en un sistema experimental controlado. Por otro lado, pueden esclarecer los mecanismos intermedios que están involucrados en el proceso de estos cambios en el músculo, así como evaluar los efectos de un tratamiento farmacológico o un entrenamiento.

Sin embargo, uno de los grandes retos que tiene el investigador, una vez obtenidos los datos del modelo animal, esta poder extrapolar o intuir, lo que hubiera ocurrido en el paciente. Es por esta razón, que la elección de uno u otro modelo experimental, está condicionado a los requerimientos de las hipótesis planteadas al inicio de la investigación.

En el estudio de los músculos respiratorios, desde la óptica de patologías como la EPOC ó el asma, o desde la óptica de la utilización de fármacos, se han empleado con mucha frecuencia diferentes tipos de modelos experimentales animales. Los modelos experimentales más frecuentes en este campo reproducen en los animales protocolos experimentales de: cargas inspiratorias y/o espiratorias, inmovilización o ejercitación de músculos, estimulación eléctrica, acción de fármacos, entre otros. Y en dependencia del protocolo seguido en la investigación se reproducen estadios crónicos, sub-agudos o agudos de la enfermedad. Y esto nos permitirá determinar cual o cuales son los mecanismos implicados en el desarrollo de cada proceso fisiológico.

Frecuentemente estos modelos experimentales se han utilizado con el objetivo de evaluar en los músculos respiratorios la presencia de daño de membrana e inflamación en la fibra muscular (Road y Jiang, 1998; Jiang, 1998 a y b; Reid y McGowan, 1998), los procesos de muerte celular programada (apoptosis) y necrosis (Hamzaoui, 1999), el efecto del envejecimiento (Gosselin, 1992 a y b; Tolep y Kelsen, 1993), la acción de corticoides y otros fármacos (Lieu, 1993; Polla, 1994; Gayan-Ramirez y Decramer, 1998), los efectos producidos por el estrés (Zuo, 2000), el papel que desempeña el óxido nítrico y los radicales libres (Reid, 1992; Fujii, 1998), los efectos provocados por determinados ejercicios (Dempsey 1996) así como las variaciones morfológicas y estructurales de las fibras sometidas a estas cargas respiratorias musculares (De Troyer, 1992 a y b, 1997; Mattson y Poole, 1998; Gea, 2000).

Los animales utilizados en estos modelos experimentales son muy variados en dependencia de los intereses propios de cada investigación. Los más utilizados han sido las ratas y ratones (Gosselin, 1992 a y b; Reid, 1992; Lieu, 1993; Desphande, 1993; Polla, 1994; Bisschop, 1997; Fujii, 1998), así como hamsters (Mattson y Poole, 1998). También

encontramos con mucha frecuencia estudios realizados en gatos (Burnet, 1992), conejos (Simpson, 1995; Yang, 1996, 1997; Williams, 1998, 1999; Elton, 1998; McKoy 1998, 1999), perros (Criner, 1994; Zhu, 1997; Gea, 1997, 2000), ovejas y caballos (Franchini, 1998). Los animales de menor tamaño son muy utilizados por su fácil acceso y mantención, en modelos que simulan procesos agudos o son de corta duración. Sin embargo, cuando se trata de desarrollar modelos que simulan procesos crónicos, donde la instrumentalización del animal es compleja y mantenida en el tiempo, es necesario utilizar animales de mayor tamaño.

1,6- DAÑO DE MEMBRANA CITOPASMÁTICA.

La regulación de los ciclos de contracción muscular están estrechamente relacionados con las variaciones de las concentraciones del Ca^{2+} intracelular. En la medida que existe un incremento de las contracciones musculares aumenta en la fibra la concentración intracelular de calcio libre. Estos iones son rápidamente captados por diferentes proteínas, como la troponina C, y se activan mecanismos como la captación del Ca^{2+} por el retículo sarcoplásmico y la bomba de ATP, para evitar el aumento de su concentración dentro de la fibra muscular (Byrd, 1991). En la medida que el ejercicio es más intenso y duradero existe una mayor dificultad para que sean efectivos los mecanismos de eliminación de Ca^{2+} y por ende los niveles de calcio libre aumentan en la célula (Gollnick, 1971; Byrd, 1989 a y b).

En condiciones fisiológicas, las concentraciones de Ca^{2+} en el músculo esquelético tienen un papel fundamental en el mantenimiento de la estructura de la membrana, y en la función celular de las fibras musculares (Byrd, 1991). Mientras que las bajas concentraciones de Ca^{2+} son necesarias para el correcto funcionamiento de la fibra muscular, las altas concentraciones de Ca^{2+} libre dentro de la fibra están asociadas al aumento del tamaño de las miofibrillas, el daño de membrana y la muerte fibrilar (Fleckenstein, 1971; Trump, 1980).

El daño de los músculos respiratorios puede ser el resultado de un exceso de cargas mecánicas (Reid y McGowan, 1998). Otras condiciones como la hipoxemia, hipercapnia, el envejecimiento, la desnutrición o la inmovilización pueden también ocasionar daño en los músculos respiratorios (Reid y McGowan, 1998).

Experimentalmente se ha inducido daño en los músculos respiratorios actuando directamente sobre el músculo, estimulando o seccionando el nervio frénico, provocando altas cargas resistivas inspiratorias (oclusión traqueal) y utilizando corticoesteroides (Zhu, 1997; Reid y McGowan, 1998; Gea 2000). Aunque numerosos ejemplos de daño en los

músculos respiratorios han sido demostrados en modelos animales, la evidencia de estos hallazgos en el hombre es escasa (Gea, 1999; Orozco-Levi, 1999). Se han postulado varios mecanismos etiológicos que podrían producir daño en los músculos respiratorios. Alguno de estos mecanismos pueden ser: altos niveles intracelulares de enzimas degradativas activadas por el calcio, variaciones desordenadas en la contracción y relajación del músculo, disrupciones de la membrana plasmática y la activación de procesos inflamatorios provocados por las cargas respiratorias (Reid y McGowan, 1998).

El ejercicio intenso también se ha planteado como una causa de daño de membrana. Sin embargo tradicionalmente se ha considerado que este daño no conduce al deterioro del músculo sino que, por el contrario, desencadena en el mismo, procesos de remodelación estructural que lo hacen más eficiente. En el estudio realizado a principios del siglo XX, se planteó por primera vez la hipótesis directa de una asociación entre el ejercicio y el daño de membrana de las células musculares esqueléticas. Con posterioridad, esta hipótesis ha sido ampliamente confirmada por muchos autores (McCully, 1991; Byrd, 1991; Clarkson, 1992; Lieber y Fridén, 1993, Lieber, 1996; Zhu, 1997; Komulainen, 1998 y 1999) utilizando diferentes modelos experimentales realizados en animales.

Estos autores han podido valorar el daño y la magnitud de éste en las fibras musculares después de haber sido sometidas a diferentes protocolos experimentales utilizando técnicas que permiten detectar la localización aberrante de diferentes proteínas intra o extracelulares (por ejemplo: actina, desmina, fibronectina y distrofina) (Fridén y Lieber, 1998). Por otro lado, también se puede detectar el daño de membrana utilizando moléculas de bajo peso molecular que difundan a través de los pequeños poros que presentan las fibras dañadas. Un ejemplo de esta última valoración de daño es la administración del colorante *Procion orange* a los animales por vía endovenosa. Este colorante de bajo peso molecular ($C_{19}H_{12}Cl_2N_8O_9S_2$, PM 631,4 daltons) difunde hacia el interior de la fibra y posteriormente se puede detectar por fluorescencia dentro del sarcolema fibrilar (Johnson y Nogueira, 1981; Zhu, 1997). Otra forma de medir el daño presente en las fibras musculares es analizando el porcentaje de sarcómeras dañadas presentes en el tejido (De Troyer, 1997).

Sin embargo, los mecanismos de recuperación de la fibra muscular después del daño de membrana producido por el ejercicio o el entrenamiento, todavía hoy permanecen sin esclarecer (Clarkson, 1992; Road y Jiang, 1998). Tampoco se conoce si el daño forma parte del inicio de un proceso de remodelación de la fibra muscular o si, por el contrario, estos eventos suceden simultáneamente pero independientes en la fibra muscular.

Estudios realizados por Zhu y colaboradores (1997) utilizando la técnica de detección de *Procion orange* intracelular, permitieron evaluar el daño producido en los animales después de haberlos sometido a un período de cargas resistivas inspiratorias agudas (2 h por día durante un período de 4 días consecutivos) y de elevada intensidad. Estos autores encontraron que muchas células del diafragma presentaban en su citoplasma el colorante que había difundido a través de la membrana celular. La presencia del colorante dentro del citoplasma posiblemente se debía a pequeñas interrupciones de la membrana ocasionadas por las cargas resistivas inspiratorias que permitían la difusión del mismo al interior de la célula. Evidentemente, este hecho ratifica que después de aplicarse el protocolo de cargas inspiratorias resistivas, las fibras musculares presentaban alteraciones de la membrana celular, que permitían la entrada de diferentes moléculas hacia el interior del citoplasma. Sin embargo esto no ocurría en la totalidad de las fibras musculares analizadas (Zhu, 1997).

El estudio realizado por Zhu y colaboradores (1997) presenta la limitación de analizar el daño de membrana solamente al final del protocolo de cargas. Esto se debe a que la técnica que ellos utilizaron no permite administrar este colorante al animal y después someterlo a un período de cargas debido a la acción tóxica del mismo. En este trabajo no disponen de una biopsia inicial del músculo; y por ello, no pueden determinar el nivel de daño inicial que presentaba el músculo (Zhu, 1997).

Otro estudio realizado en este caso por Fridén y Lieber (1998) para evaluar daño de membrana, después de la aplicación de ejercicios excéntricos al músculo *extensor digitorum longus*, pone en práctica una técnica inmunohistoquímica para determinar la presencia de acúmulos de fibronectina dentro del citoplasma celular (Vartio, 1987), así como la pérdida de desmina del citoplasma, como consecuencia del daño.

Vartio (1987) para desarrollar las técnicas inmunohistoquímicas se basó en la ubicación de la fibronectina y la desmina en el tejido. La fibronectina, es una proteína de elevado peso molecular, aproximadamente 500 kD, y se encuentra ubicada normalmente en la parte externa de la fibra muscular uniendo, a través de sus receptores anclados en la membrana fibrilar, el colágeno a la membrana (Vartio, 1987). Por otro lado, la desmina es una proteína de bajo peso molecular, aproximadamente 53 kD, y no se encuentra en el exterior de las fibras. Su localización es en el citoplasma celular (Fridén y Lieber, 1998). La presencia de fibronectina o la ausencia de desmina en el interior de la fibras, indica que se han producido interrupciones en la membrana

A diferencia de la técnica utilizada por Zhu (1997), estas dos formas de medir el daño de membrana, detectando la presencia de fibronectina intracelular o la ausencia de desmina del citoplasma celular, permiten realizar una evaluación inicial y una evaluación final del músculo; y con ello, conocer los cambios producidos por la aplicación de las cargas.

1,7- EXPRESIÓN DE LAS CITOCINAS TNF- α Y IL-10 INDUCIDAS POR LA APLICACIÓN DE CARGAS.

Las *citocinas* son proteínas pequeñas, no estructurales, con un rango de peso molecular entre 8 y 40.000 daltons. Originalmente estas proteínas fueron llamadas linfocinas y monocinas atendiendo a las poblaciones celulares que las producían y donde primero fueron descritas (Dinarello, 2000 a y b). Actualmente se les da el nombre de citocinas ya que en realidad la mayoría de las células nucleadas son capaces de sintetizarlas como respuesta a un determinado estímulo. De forma general estas proteínas se producen como respuesta frente a diferentes estímulos externos como: infecciones, inflamación, estrés y daño de tejidos, así como en diferentes momentos durante la respuesta inmune.

Las características más comunes que presentan este grupo de proteínas son: Se producen durante la fase efectora de la inmunidad natural y específica, actuando como reguladores de la respuesta inmunitaria; la expresión de estas proteínas generalmente es un hecho transitorio y no se almacenan en el organismo; en la mayoría de los casos tienen un origen múltiple ya que son producidas por varios tipos celulares; presentan una acción pleiotrópica, sobre muchos tipos de células en el organismo; pueden tener una actividad redundante debido a que varias de ellas pueden inducir el mismo efecto. Otras características comunes de estas moléculas son que actúan en forma de *cascada* en el organismo, de forma tal que pueden ser inhibidas o estimuladas las unas por las otras. Su acción siempre está mediada por receptores y su actividad puede ser endocrina, paracrina o autocrina, en dependencia de que actúen a nivel de todo el organismo, entre células contiguas, cercanas o sobre la misma célula que la produce, siendo estos dos últimos los más comunes (Celada, 1994).

Las citocinas tienen un papel importante en los procesos infecciosos y/o los procesos inflamatorios en el organismo. Algunas facilitan el desarrollo de los procesos inflamatorios, y son las llamadas citocinas inflamatorias. Un ejemplo de estas citocinas lo tenemos en la interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), así como otras quimiocinas que también destacan por su papel en el desarrollo de procesos inflamatorios. Por el contrario, existe otro grupo de citocinas que actúan para reducir o atenuar los procesos de inflamación, y mejoran el curso de la enfermedad. Estas últimas son las llamadas citocinas

anti-inflamatorias. Como un ejemplo de ellas podemos citar las citocinas: IL-4, IL-10 y IL-13. Estas moléculas son potentes activadores de los linfocitos B, y por otra parte, tienen la facultad de inhibir los genes que expresan citocinas tales como el TNF- α y la IL-1 (Dinarello, 2000 a y b).

Esta forma de clasificar las citocinas en inflamatorias o anti-inflamatorias tiene como base el criterio biológico y clínico al agruparlas por la función primaria que realizan frente a un proceso inflamatorio. Sin embargo, estas proteínas tienen muchas otras funciones en el organismo, y en muchos casos se ven involucradas en procesos opuestos o complementarios como ya se ha mencionado anteriormente.

Existe otro grupo de citocinas que son los denominados interferones (IFN). El IFN- α , IFN- β y IFN- γ demuestran una gran actividad anti-viral y por otro lado el IFN- γ es un potente activador de las células citotóxicas. Los interferones también se consideran dentro de las citocinas inflamatorias porque estimulan la expresión de TNF- α e inducen la producción de óxido nítrico, que también tiene un importante papel en el desarrollo de procesos inflamatorios y en el estrés (Dinarello, 2000 b).

1,7,1- Estudios que analizan la expresión de las citocinas en pacientes con enfermedades obstructivas respiratorias.

Como ya se ha expresado anteriormente, después de la aplicación de cargas resistivas a un músculo no sólo aparece el daño de membrana celular, sino que también se ha descrito la existencia de procesos inflamatorios.

La mayoría de los estudios realizados en pacientes con enfermedades respiratorias están encaminados a la búsqueda del papel que desempeñan las citocinas en estas enfermedades, ya sea analizando su presencia en el esputo (Yamamoto, 1997; Kanazawa, 1998; Hill, 1999; Fujimoto, 1999), el lavado bronquio-alveolar y las biopsias de mucosa bronquial (Chyczewska, 1997; Zissel, 1997; Pesci, 1998; Buhling, 1999), o bien mediante la cuantificación en sangre periférica de estas proteínas (Majori, 1999). Estos estudios mencionados, han sido realizados fundamentalmente en pacientes fumadores y no fumadores que padecen enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o asma bronquial.

Haciendo un análisis de los resultados publicados hasta el momento en este campo, en los pacientes que padecen enfermedades respiratorias obstructivas, se puede apreciar la

enorme relevancia que va adquiriendo día a día el estudio de las citocinas. En el estudio realizado por Majori (1999) se destaca que los pacientes con EPOC presentan un aumento en sangre de células productoras de IFN- γ y una disminución de células productoras de IL-4, cuando son comparados con sujetos control (Majori, 1999). Estudios realizados por Peleman (1998) sobre el efecto de la teofilina en pacientes asmáticos demostraron que este fármaco tiene un potente efecto inhibitorio sobre la producción de IL-1, TNF- α y IFN- γ , mientras que mantiene incrementada la expresión de citocinas anti-inflamatorias como la IL-10 (Peleman, 1998). Trabajos realizados para evaluar los efectos del tratamiento prolongado con los corticoides (budesonida) en pacientes con EPOC, reflejan que disminuyen en sangre los niveles de IL-8 (citocina involucrada en la activación y migración de neutrófilos) y se reducen los neutrófilos. Por estas razones, estos autores, aconsejan tratamientos a largo plazo con budesonida con el objetivo de mejorar la sintomatología que presentan estos pacientes (Rutgers, 1998).

En un estudio realizado por Pesci (1998) en pacientes fumadores con EPOC pone de manifiesto que el propio hábito del tabaco en estos pacientes se asocia con un incremento de la cantidades de IL-8, factores quimiotácticos producidos por los neutrófilos y eosinófilos; y a su vez estas poblaciones celulares activadas incrementan la producción de mediadores inflamatorios capaces de aumentar el daño del tejido bronquio-alveolar (Pesci, 1998). En igual dirección, otros estudios que analizan el aumento de IL-8 en esputo de pacientes con EPOC encuentran que esta citocina se correlaciona negativamente con los valores de la función ventilatoria, específicamente con el cociente volumen espiratorio forzado/ capacidad vital forzada (FEV₁/FVC). Esto indica que cuanto mayor es el nivel de obstrucción de las vías aéreas, mayores son los niveles de IL-8 detectados. Estos autores también reseñan que los niveles de IL-8 están estrechamente asociados al grado de atrapamiento aéreo (Yamamoto, 1997).

Cabe señalar que los mecanismos de expresión, que presentan estas citocinas, en cada una de las enfermedades obstructivas no tiene por qué ser el mismo. En estudios realizados por Hamzaoui (1999) analizando el esputo de pacientes con EPOC y asma, demuestra que en ambas patologías hay un aumento en el esputo del porcentaje de neutrófilos, eosinófilos y linfocitos. Sin embargo, las células mononucleares inductoras de la apoptosis se encuentran disminuidas en pacientes con asma cuando son comparados con los que presentan EPOC. Estos autores cuantificaron la apoptosis después de la administración de anticuerpos anti-citocinas y encontraron que en pacientes con asma y EPOC el anti-TNF- α bloquea los procesos de apoptosis. Sin embargo, en los controles sanos la acción de este mismo

anticuerpo induce la apoptosis. Por otra parte, el uso de anti IL-10 exógena sólo inhibe los procesos de apoptosis en los pacientes con asma y no en aquellos con EPOC (Hamzaoui, 1999).

1,7,2- Estudios que analizan la expresión de citocinas, y los mecanismos de función e interrelación fisiológica en el músculo esquelético.

Actualmente existe un gran vacío teórico a la hora de analizar el papel que desempeñan las citocinas, anti-inflamatorias e inflamatorias, en los músculos esqueléticos. Los trabajos más actuales comienzan a esclarecer los mecanismos y las funciones que tienen estas moléculas en el músculo esquelético, en diversas patologías como las miopatías, las neuropatías degenerativas (Zhang, 2000; De Letter, 2000), la dermatositis, la polimiositis (Megens-de letter, 1999) y la artritis reumatoide (Normang, 1997). Sin embargo no es posible encontrar en la literatura científica trabajos relacionados con la expresión y el papel que desempeñan las citocinas en los músculos de pacientes con enfermedades obstructivas respiratorias.

En cultivos de mioblastos humanos se probó la capacidad de expresar diferentes tipos de citocinas inflamatorias. Se ha confirmado que estas células expresan IL-1 y IL-6 constitutivamente, mientras que IL-1 y TNF- se detectan después de ser tratados los cultivos con citocinas inflamatorias (De Rossi, 2000). Por otro lado, Zhang (2000) demuestran la expresión de los receptores de IL-1 (tipo I y II), IL-6R y IFN- R, en músculos esqueléticos de ratas después de la administración de endotoxinas (Zhang, 2000).

En un estudio realizado por Greiwe (2001) utilizando la técnica de hibridación "*in situ*" encuentra que hay expresión de TNF- en las células musculares esqueléticas. Los niveles de TNF- se incrementan con la edad y se cree que el TNF- juega un papel importante en los procesos de pérdida de masa muscular en diferentes enfermedades como infecciones crónicas, cáncer y otras enfermedades crónicas (Espat, 1994), así como también en la hipoxia (Chandel, 2000). Greiwe y col. (2001) también demuestran que el ejercicio de resistencia induce una regulación negativa de los niveles de TNF- , y sugieren que estos ejercicios contribuirían a atenuar la pérdida muscular, que tiene lugar con la edad (Greiwe, 2001).

El TNF- induce apoptosis asociada con la supresión del factor de crecimiento de insulina (IGF). El IGF, por su parte, es el responsable esencial del mantenimiento y diferenciación del músculo esquelético. Es por esta razón que, la inhibición del IGF mediada por el TNF-

está asociada a la pérdida de masa muscular y caquexia en pacientes con cáncer y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Di Francia, 1994; Meadows, 2000). En un estudio relacionado con la utilización de anti-TNF- α se pudo observar que la administración del anticuerpo neutralizador disminuyó los procesos de apoptosis de las células mononucleares presentes en el esputo (Hamzaoui, 1999). Esto confirma el papel que juega el TNF- α en la inducción de los procesos de apoptosis celular.

Por otra parte, el tratamiento crónico con TNF- α produce una disminución importante de la síntesis de proteínas miofibrilares específicas (MyHC, MyLC, actina) en el diafragma de ratas (Cheema, 1999). El mecanismo mediante el cual se produce esta regulación es post-transcripcional; por una parte interfiere en la iniciación de la traducción proteica (Cheema, 2000) y por otra parte induce la degradación proteica utilizando como mediador esencial el factor nuclear-kappa (NF-kappa) (Li y Reid, 2000).

En estudios realizados con deportistas se demuestra que después de un ejercicio prolongado aparece un aumento en plasma de las citocinas TNF- α y IL-6, IL-1, del receptor antagonista IL-1, y del receptor de TNF (Brenner, 1999; Pedersen, 2000; Pedersen y Toft, 2000). Brenner (1999) realizó un estudio para determinar el comportamiento de la IL-6 y el TNF- α en diferentes tipos de ejercicios y a su vez, comparar las variaciones en la expresión de estas citocinas con los marcadores tradicionales de daño, como es el aumento en sangre de la creatina quinasa (CK), y la actividad citolítica de las células natural *killer*. Estos autores observaron que no existe una correlación directa entre la expresión en sangre periférica de los marcadores tradicionales de daño muscular y la cuantificación de las citocinas analizadas después del ejercicio. Sin embargo, encuentran diferencias en la expresión de citocinas que tienen relación con el tipo de ejercicio desarrollado. Estos autores sugieren que la relación entre ambos marcadores es dependiente no solo del tipo de ejercicio realizado, sino también de la intensidad del mismo.

Por ejemplo, después de ejercicios prolongados hay un aumento considerable de la expresión de IL-6 y TNF- α en sangre (Brenner, 1999). En otros estudios realizados en corredores de maratón se determinó que los niveles en plasma de IL-10 aumentaban después del ejercicio. Sin embargo, los niveles de IL-1 y IFN- γ no presentaron cambios al finalizar el mismo. Estos autores no pudieron detectar presencia alguna de IL-12, IFN- γ y TNF- α una vez finalizado el ejercicio (Suzuki, 2000).

Otro estudio importante realizado en este campo por Smith (2000), trata de esclarecer el papel fisiológico que tienen las citocinas en la adaptación al estrés que sufren los deportistas de alto rendimiento después de un sobreentrenamiento. Estos autores plantean que un elevado número de monocitos activados circulantes en sangre y la consecuente producción de citocinas TNF- α y/o IL-6 modulan la respuesta del organismo actuando sobre el sistema nervioso central e induciendo una serie de respuestas que detienen el curso de procesos inflamatorios. Las citocinas también actúan sobre la función del hígado para de esta forma regular la utilización de proteínas del músculo durante los procesos de demanda del organismo, situación presente en los procesos hipercatabólicos, y en la síntesis de nuevas proteínas. Y por descontado está el papel que las citocinas pueden jugar modificando el curso de las respuestas del sistema inmune (Smith, 2000).

Utilizando un modelo animal para provocar isquemia de las extremidades posteriores en ratas, Engles (1997) administraron IL-10 exógena. Estos autores encontraron que los animales a los cuales se le administró IL-10 presentaban una disminución de la permeabilidad capilar y del daño de membrana del músculo *soleus* en comparación con aquellas ratas a las que no se le administró IL-10. Este último grupo no sólo presentó mayor daño de las fibras musculares sino también presentó un aumento en plasma de TNF (Engles, 1997).

Otro estudio realizado con el diafragma de ratones, a los que se le administró endotoxinas, se pudo observar que el grupo que recibió suplemento de IL-10 exógena, el daño del músculo producido por las contracciones inducidas por la endotoxina era mucho menor. Estos autores concluyeron que la administración de IL-10 inhibe el daño provocado en el músculo diafragmático por la administración de endotoxinas, utilizando para ello la vía de la inhibición de la producción de óxido nítrico en el músculo (Taneda, 1998).

Resumiendo, la mayoría de los trabajos revisados confluyen en destacar el papel protector que tiene la IL-10 para el músculo, frente a procesos isquémicos producidos por endotoxinas que inducen daño de la fibra muscular e inflamación.

No hemos encontrado ningún trabajo directamente relacionado con la función de las citocinas, inflamatorias y anti-inflamatorias, en los músculos respiratorios, ni tampoco, el papel que ellas tienen en relación al daño fibrilar o la inflamación producida específicamente por la aplicación de cargas inspiratorias resistivas.

Ahora bien, si tenemos en cuenta el importante papel que tiene el entrenamiento de los músculos en la mejora de la calidad de vida y de la sintomatología que presentan los paciente con enfermedades obstructivas, se hace necesario diseñar estudios experimentales que permitan esclarecer la función que tienen las citocinas en los músculos esqueléticos (no sólo respiratorios) de pacientes con enfermedades obstructivas. Así como, esclarecer el papel que desempeñan estas citocinas en la remodelación de los músculos respiratorios provocadas por el entrenamiento, atendiendo especialmente al tipo, intensidad y duración del mismo. En esta misma dirección, es necesario profundizar en la relación que puede o no existir entre la expresión de las citocinas (inflamatorias o anti-inflamatorias) y el daño fibrilar provocado por las sobrecargas musculares.

1,8- LA REMODELACIÓN MUSCULAR.

Es por todos conocido que existen una serie de factores internos y externos que pueden modificar la estructura de los músculos esqueléticos. A este cambio en la estructura de las fibras musculares se le denomina remodelación.

El ejercicio es uno de los factores externos que más evidencia un cambio en el tamaño y composición de la fibras musculares. A tal extremo el ejercicio induce cambio en la fibra muscular que ésta puede modificarse en una u otra dirección en dependencia del tipo y la intensidad de ejercicio realizado.

Con el objetivo de determinar cambios morfológicos y estructurales que se producen en un músculo entrenado se han realizado diversos trabajos de investigación. Por ejemplo, se ha comprobado en estudios realizados en el músculo *vastus lateralis* de corredores que después de tres meses de entrenamiento decrece la cantidad de fibras que sólo expresan MyHC I; y se incrementa la cantidad de fibras que expresan MyHC IIa. Las fibras que coexpresaban las MyHC IIa y IIb disminuyen y sólo una de cada mil fibras expresa al final la isoforma IIb. Estos autores llegan a la conclusión de que el entrenamiento de este músculo provoca un aumento de la expresión de MyHC IIa o una transformación de la isoformas I y IIb en IIa (Andersen, 1994).

Sin embargo, la remodelación del músculo puede ser inducida por otros factores de naturaleza deletérea como pueden ser enfermedades autoinmunes (las miopatías en general), la edad y la nutrición del individuo, entre otras. Estos factores también pueden provocar cambios en el tamaño y composición de las fibras musculares, que no conducen a

una mayor eficiencia muscular sino que, por el contrario posibilitan la pérdida de masa muscular, la pérdida de fuerza y la fatiga del músculo.

En este trabajo hacemos más énfasis en la remodelación entendida como la transformación estructural que ocurre en el músculo respiratorio como consecuencia de la aplicación de cargas (p.e. en la EPOC). Este proceso en los músculos respiratorios hace más eficiente su función y evita la fatiga, de esta forma permite los gradientes de presión necesarios para mantener la ventilación. Sin embargo, esta remodelación no se observa en la misma dirección en el músculo periférico vasto lateral de pacientes con EPOC. En este músculo los cambios expresan una dirección opuesta a los músculos respiratorio.

Visto de una manera general, las cargas inspiratorias producidas en el individuo por enfermedades obstructivas, se traducen a nivel de los músculos respiratorios en un efecto “entrenamiento”, similar al que se produce en los músculos esqueléticos en general después de un ejercicio. Sin embargo, en los pacientes con EPOC estos cambios en la musculatura respiratoria a nivel celular y subcelular, dependen del grado de atrapamiento aéreo, la edad, la nutrición, la actividad física general del individuo, entre otros. Por otro lado, es importante tener en cuenta a la hora de evaluar los cambios la condición de fumador o exfumador del paciente. Esto es debido a que el propio hábito tabáquico podría modular la respuesta del músculo al ejercicio a la ausencia de este.

La función ventilatoria, tanto la inspiratoria como la espiratoria, se puede ver alterada en el curso de diversas enfermedades respiratorias agudas como: la muerte por asfixia, el asma fatal y el síndrome de la muerte súbita del lactante. Estudios realizados en el músculo diafragmático de pacientes fallecidos por estas patologías han demostrado la presencia de daño de membrana en las fibras del diafragma (Silver y Smith, 1992).

Por otro lado, existe un grupo de enfermedades respiratorias tales como infecciones de las vías aéreas, asma bronquial, obstrucciones inspiratorias transitorias producidas dentro de la apnea del sueño y la EPOC que, aunque no provocan una muerte inmediata en el paciente, producen durante largos períodos de tiempo un aumento de la resistencia al flujo aéreo. Este aumento de la resistencia al flujo aéreo es gradual y está relacionado con la gravedad de la enfermedad.

Las patologías mencionadas producen un aumento de las cargas respiratorias de forma crónica, más o menos persistentes en el tiempo y/o un reclutamiento temporal o permanente de sobrecarga en los músculos respiratorios para garantizar una adecuada ventilación.

En estudios realizados en estas enfermedades obstructivas crónicas se ha comprobado la presencia de daño de membrana en las fibras de los músculos respiratorios (Grassino, 1989; Reid y McGowan, 1998; Orozco-Levi, 2001) y también se han descrito procesos inflamatorios (Reid y McGowan, 1998). Sin embargo, como la claudicación de los músculos respiratorios es incompatible con la vida, el sobreesfuerzo muscular al que se ven sometidos dichos músculos durante el desarrollo de estas enfermedades produce un “remodelamiento” estructural y funcional a nivel de las fibras musculares que las hace más eficientes en su función ventilatoria (Russell, 1992). En términos más generales, estas patologías crónicas de hecho someten a los músculos respiratorios a un “*entrenamiento*” producido por las cargas inspiratorias y espiratorias a las que están sometidos y, como consecuencia inducen un cambio o remodelamiento en su estructura fibrilar.

1,8,1- Cambios estructurales en los músculos respiratorios ocasionados por la EPOC.

En resumen, se puede apreciar que es un tema debatido la existencia y el tipo de fenómenos estructurales (celulares y moleculares) que pueden asociarse a la disfunción respiratoria (p.e. EPOC). Hasta el momento actual existe controversia sobre si la respuesta es de naturaleza degenerativa o de tipo adaptativo. Este motivo que ha llevado al uso del término “remodelación” en los músculos respiratorios da cabida a estas dos posibilidades de cambio muscular. Los fenómenos de remodelación se pueden apreciar en estos pacientes a diferentes niveles.

a) A nivel celular.

Los estudios morfológicos realizados en el músculo respiratorio han aportado resultados contradictorios sobre el tamaño de las fibras musculares en la EPOC.

Los primeros estudios se realizaron a partir de muestras obtenidas de necropsias con resultados distintos en cuanto al tamaño de las fibras del diafragma en la EPOC. Algunos autores sugieren atrofia (Steele y Heard, 1973, Butler 1976, Thurlbeck 1978) y otros sugieren ausencia de cambios (Arora y Rochester 1982). Posteriormente y también en muestras de cadáveres, Mizuno demostró cambios en la EPOC similares a los observados en los atletas con un sobreesfuerzo importante de su musculatura, con un 16% de reducción

del diámetro menor de las fibras del diafragma tanto de las lentas como de las rápidas (Mizuno 1991). El principal inconveniente de este estudio está en las modificaciones que se producen en este tipo de muestras, debido principalmente a fenómenos de naturaleza *post-mortem*, como la muerte celular y la rigidez cadavérica.

En cuanto a las muestras procedentes de toracotomía los resultados también han sido contradictorios. Sánchez (1982) en un estudio con muestras de diafragma e intercostales demostró la ausencia de correlaciones significativas entre el tamaño y la tipificación de la fibras, objetivando solamente una tendencia a la atrofia de la fibras del grupo con un valor de la medida del volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV₁) más bajo (Sánchez, 1982). Trabajos recientes de nuestro grupo no parecen confirmar este hallazgo (Borrat, 2000).

Otros autores han evidenciado que los cambios morfológicos y metabólicos en la EPOC no se limitan de forma exclusiva a la musculatura respiratoria, sino que por el contrario, son comunes a músculos respiratorios y no respiratorios. Este hecho no permite establecer una relación simple entre cambios morfométricos específicos de músculo respiratorio y función pulmonar. De esta forma adquieren relevancia otros factores sistémicos como la nutrición y el tamaño corporal (Hughes, 1983).

Posteriormente los estudios de nuestro grupo: Aguar (1995), Sauleda (1998), Orozco-Levi (1999), han mostrado una tendencia hacia la bimodalidad en la distribución del tamaño de las fibras en otros músculos respiratorios, con una disminución global general asociada al nivel de sobrecarga, acompañada de la aparición de una pequeña moda de fibras hipertróficas. Esta última probablemente expresaría un intento de adaptación de músculo. Aguar (1995), que ha trabajado con muestras de intercostales externos obtenidos por toracotomía, también ha demostrado una disminución progresiva del tamaño de sus fibras con relación al grado de atrapamiento aéreo de los pacientes. Recientemente Hernández-Frutos (2001) y colaboradores han demostrado la presencia de trimodalidad en el tamaño de las fibras en músculo (deltoides) que tiene una función ventilatoria indirecta (Hernández-Frutos, 2001)

b) A nivel subcelular.

La evaluación a nivel subcelular contempla las modificaciones producidas fundamentalmente a nivel mitocondrial y sarcomérico.

Numerosos trabajos en modelos animales y humanos han demostrado que las modificaciones en la densidad mitocondrial (Gollnick y Saltin, 1982; Saltin y Gollnick, 1983; Secher, 1984; Orozco-Levi, 1995) y en la actividad de los diversos enzimas a nivel de las mismas reflejan los fenómenos adaptativos a nivel del músculo respiratorio. La lactodeshidrogenasa (LDH) que no forma parte de la cadena glicolítica y es responsable de la producción de lactato durante la realización del ejercicio físico también participa de estos fenómenos adaptativos (Karlsson, 1972).

Los estudios realizados por Orozco-Levi (1995) en músculos respiratorios han demostrado una correlación directa entre la obstrucción al flujo aéreo y la densidad mitocondrial.

Desde el punto de vista ultraestructural los estudios se han centrado en modificaciones a nivel sarcomérico. Unos primeros resultados mostraron la pérdida de sarcómeras relacionada con la hiperinsuflación en modelos animales (Tabary, 1972; Supinski y Kelsen, 1982). Estudios más recientes realizados en un modelo animal (Poole, 1994) han demostrado que en enfisema inducido experimentalmente no se producen modificaciones en la longitud de la actina y la miosina. En nuestro grupo Orozco-Levi (1995) ha demostrado una correlación inversa entre volúmenes pulmonares estáticos y la longitud de las sarcómeras en humanos con EPOC. Es decir, las sarcómeras se acortan al progresar la EPOC, para minimizar el efecto deletéreo del acortamiento global del diafragma.

c) **A nivel molecular.**

Los cambios producidos a nivel molecular pasan por el análisis de la composición enzimática, que define el tipo de metabolismo, y el análisis de la composición de las proteínas estructurales del músculo.

Hay estudios que han medido la actividad enzimática a nivel del músculo respiratorio humano, y que han medido la capacidad oxidativa del músculo esquelético periférico de los pacientes con EPOC (Maltais, 1996 a y b, Gea, 1999 b; Blanco, 1999). Estudios realizados en nuestro grupo han demostrado una actividad conservada de los enzimas oxidativos en los pacientes con EPOC comparada con los pacientes controles.

Los pocos estudios de remodelación proteica que se han realizado en los músculos respiratorios han dado resultados similares a los observados en el músculo esquelético sometido a cargas (Hopkins, 1983; Acker, 1987; Zhan y Sieck, 1992). El entrenamiento general prolongado sólo provoca cambios moderados en las características celulares y

moleculares del diafragma (Sugiura, 1992). Sin embargo, los estudios realizados en nuestro grupo con diafragma humano no han mostrado cambios en la expresión de las isoformas de MyHC en los pacientes con EPOC moderada (Orozco-Levi, 1996). Por el contrario, en los pacientes con EPOC grave, si se observa un aumento de la expresión de la MyHC I (Gea, 2001, Casadevall, 2001).

Hay que destacar en este campo el estudio de Levine (1997), donde se ha demostrado que los enfermos que padecen una EPOC severa experimentan una sustitución progresiva de las isoformas rápidas de MyHC por las lentas en el diafragma (Levine, 1997). Este recambio a nivel de las proteínas estructurales tiene su traducción a nivel celular, de forma tal, que se incrementa el porcentaje de fibras tipo I. Parecería que estos cambios están destinados a convertir el diafragma en un músculo resistente a la fatiga.

Por otro lado, los estudios con músculo intercostal externo realizados también en pacientes con EPOC sí que han mostrado un incremento en las isoformas rápidas de MyCH (Gea, 1996). Esto se puede explicar por el tipo de actividad a la cual están sometidos estos músculos en los pacientes con una EPOC severa.

d) A nivel transcripcional de las isoformas de MyHC.

Existen estudios en modelos animales para evaluar los posibles cambios a nivel transcripcional. Uno de los más importantes en esta área ha señalado que la respiración bajo cargas inspiratorias resistivas durante un período corto pero con niveles de carga moderados-altos, estimula un aumento de la expresión de los genes que codifican para la isoforma de MyHC lenta (Gea, 1997). En humanos, el problema es más complejo, ya que la expresión de esta isoforma se halla al parecer regulada a nivel postranscripcional. Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio muestran que la transcripción del gen se encuentra reducida, pero en cambio existe un aumento de la proteína correspondiente (Gea, 2001; Casadevall, 2001). Todavía se desconoce el mecanismo interno de esta aparente contradicción, aunque se especula con el papel que juegan factores sistémicos en la represión de la expresión del gen.