

RESULTADOS.

5,1- RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO 1.

5,1,1- Validación de la técnica de detección de fibronectina intracitoplasmática para determinar daño en la permeabilidad de la membrana fibrilar.

Uno de los objetivos principales de nuestro trabajo fue evaluar la posible inducción de daño de membrana en las fibras musculares después de la aplicación de cargas en los animales estudiados. Por esta razón necesitábamos disponer de una técnica que nos permitiera determinar el porcentaje de fibras con daño de membrana en los músculos analizados dentro del modelo experimental, tanto antes como después de haber sometido al animal al protocolo de cargas inspiratorias resistivas.

La técnica de *Proción orange*, descrita por Johnson y Nogueira (1981), no nos permitía evaluar el daño inicial de membrana en la 1ª BIOPSIA y sólo podíamos hacerlo en la 2ª BIOPSIA. Esto se debe a que el colorante utilizado hay que administrarlo al animal por vía venosa al menos 24 horas antes de tomar la muestra y no están determinados los efectos hepatotóxicos del compuesto. Estos efectos a su vez, podrían interferir con las modificaciones inducidas por la aplicación del protocolo de cargas inspiratorias resistivas.

Tuvimos en cuenta fundamentalmente los trabajos publicados por Zhu (1997) y Frieden y Lieber (1998) para llevar a cabo la evaluación de otro método, que nos permitiera medir el daño de membrana antes y después de la aplicación de cargas resistivas. Evaluamos en primer lugar si la técnica de detección de acúmulos de fibronectina intracelular por inmunohistoquímica, propuesta por Vartio (1987), reconocía las mismas fibras dañadas que las detectadas por la técnica de administración de *Proción orange*.

El estudio de comparación de las técnicas de *Proción orange* vs detección de fibronectina intracelular se realizó en un modelo animal de ratones. Se estudiaron ocho ratones y los datos obtenidos están reflejados en la figura 15. El análisis de la concordancia mostró un valor de R1 de 0,82 (Se considera buena concordancia un valor > 0,7).

En cortes consecutivos de tejido muscular se localizaron los mismos campos celulares y las células que mostraron fluorescencia intracelular de *Proción orange* también estaban marcadas con fibronectina intracitoplasmática (figura 7. Pág. 43). Las biopsias musculares obtenidas de los ratones se analizaron por ambas técnicas. Los resultados obtenidos por las dos técnicas fueron idénticos tal como se puede observar en la figura 15 que refleja una excelente concordancia.

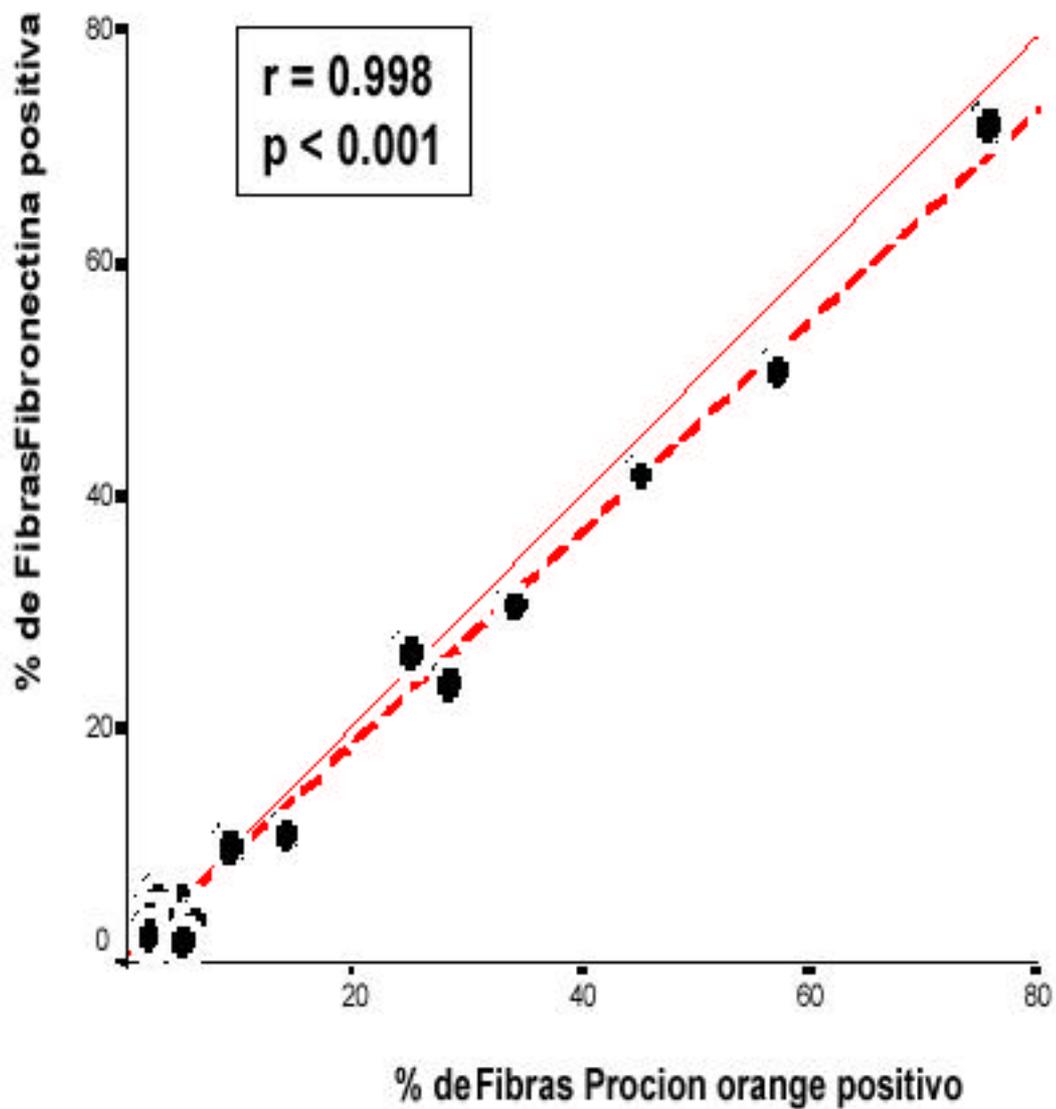


Figura 15. Gráfico de correlación de los valores experimentales obtenidos en cortes de tejido consecutivo de músculo (vastus mediales) de ratón raza Swiss. Comparación de la técnica de determinación de daño de membrana **Procion orange** vs detección de fibronectina intracelular. La línea continua representa la identidad, mientras que la línea discontinua corresponde a la obtenida en el estudio de regresión.

Con esta comparación entre las dos técnicas concluimos que los resultados obtenidos por la técnica “*gold standard*” de identificación con *Proción orange* para la determinación de células con daño de membrana son similares a los obtenidos utilizando la técnica inmunohistoquímica para determinar acúmulos de fibronectina intracitoplasmática.

5,2- RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO 2.

Los resultados obtenidos en este estudio 2 hacen referencia a las modificaciones encontradas en los músculos analizados como consecuencia de la aplicación de las cargas inspiratorias resistivas a los animales.

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.

Los valores medios reflejados en la tabla resumen I para las variables de: tipificación de fibras I y II, tamaño de las fibras I y II, porcentaje de isoformas de MyHC I y II, porcentaje de fibras híbridas y porcentaje de daño de membrana fibrilar corresponden a las 1ª BIOPSIAS de todos los animales incluidos en el estudio en los tres músculos.

El grupo consta de un número de 14 animales (tres animales pertenecen al grupo control y once animales fueron inicialmente incluidos en el grupo estudio). De todos estos animales se disponía de las valoraciones realizadas en las 1ª BIOPSIAS.

Como se puede apreciar en la tabla I, en cuanto a la composición fibrilar, el porcentaje de fibras tipo I y II, presenta valores significativamente mayores ($p < 0,05$) de fibras tipo I en todos los músculos estudiados. De igual forma se comportan los valores obtenidos para el porcentaje relativo de la isoforma MyHC I en los músculos, aunque, como se puede apreciar en la tabla las diferencias no llegan a ser significativas en el músculo intercostal externo.

La relación porcentual de la isoforma de MyHC I es menor significativamente ($p < 0,01$) en los músculos respiratorios si la comparamos con el músculo vasto interno ($72,0\% \pm 2,8$). Sin embargo, los valores porcentuales de la isoforma MyHC II son significativamente ($p < 0,01$) mayores en los músculos respiratorios ($45,4\% \pm 2,8$ y $41,3\% \pm 3,9$) si los comparamos con el vasto interno ($27,7\% \pm 2,8$). Además, es de destacar que los porcentajes de MyHC II difieren significativamente ($p < 0,01$) entre los músculos respiratorios, siendo el intercostal externo el que presenta un mayor porcentaje de MyHC II ($45,4\% \pm 2,8$).

Los resultados obtenidos referentes a la composición fibrilar y la relación porcentual de las isoformas de MyHC son coherentes con los tipos de funciones que realizan estos músculos. El músculo vasto interno presenta más fibras tipo I. La relación entre ambas isoformas de MyHC es de 7:3. Mientras que la relación tipo I vs tipo II, en los músculos respiratorios, es

TABLA I Tabla resumen de resultados.
 Valores medios \pm e.s. obtenidos en las variables estudiadas antes de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas, en los músculos intercostal externo, diafragma y vasto interno, de todos los animales.

MÚSCULOS	FI (%)	FII (%)	F. Híbridas (%)	Dm FI (μ m)	Dm FII (μ m)	MjHC I (%)	MjHC II (%)	Dado de Membrana (%)
Intercostal Ext.	57,0 \pm 1,6 ^a	41,8 \pm 1,9 ^a	1,3 \pm 0,5	33,2 \pm 1,6	41,0 \pm 1,5 ^{bc}	54,4 \pm 2,8 ^{bc}	45,4 \pm 2,8 ^{bc}	0,2 \pm 0,1 ^{bc}
	**			**		n.s.		
Diafragma	56,3 \pm 3,1 ^b	44,7 \pm 3,2 ^b	1,9 \pm 1,0	32,1 \pm 1,6	33,2 \pm 1,5 ^c	56,5 \pm 3,9 ^b	41,3 \pm 3,9 ^{bc}	1,3 \pm 0,5 ^c
	*			n.s.		*		
Vasto Int.	69,6 \pm 2,0 ^{cd}	32,6 \pm 1,8 ^{cd}	1,7 \pm 0,6	34,1 \pm 1,4	31,5 \pm 1,4 ^d	72,0 \pm 2,8 ^{cd}	27,7 \pm 2,8 ^{cd}	1,2 \pm 0,4 ^d
	**			n.s.		**		

FI y FII - porcentajes obtenidos por inmunohistoquímica para la aplicación de fibras musculares.
 Dm FI y Dm FII - valores medios del diámetro de fibras I y II.
 MJHC I y MJHC II - porcentajes relativos entre ambos subtipos de MJHC, por distribución.
 El dato de membrana celular está calculado como el porcentaje de fibras con fibroscultura ittoacoplamiento en 100 fibras.
 Fibras híbridas con finos puntos pasantes anticuerpos anti MJHC.
 e.s. error estándar de la media.
 (*) p < 0,01 para la prueba de la U de Mann-Whitney. a) Intercostal ext. vs vasto int., b) Diafragma vs vasto int., y c) Intercostal ext. vs diafragma.
 (**) p < 0,05. (***) p < 0,01 y n.s. (no significativo) por la Prueba de Wilcoxon.

de una proporción aproximada de 5:5. Esta distribución de isoformas de MyHC I y II es similar a la encontrada, en condiciones normales, en los mismos músculos en el hombre.

En relación al tamaño de las fibras musculares se observa que las fibras II del músculo intercostal externo son mayores ($p < 0,01$) que las fibras I. Sin embargo, no apreciamos cambios significativos entre los tamaños de las fibras I y II en el diafragma ni en el vasto interno (tabla I).

Las fibras I de los tres músculos estudiados presentan un tamaño similar. Sin embargo, las fibras tipo II del vasto interno ($31,5 \pm 1,4 \mu\text{m}$) son significativamente menores ($p < 0,01$) que las del intercostal externo ($41,0 \pm 1,5 \mu\text{m}$). Por otra parte, también entre los músculos respiratorios existen diferencias significativas entre los tamaños de las fibras tipo II. Las fibras II del diafragma ($33,2 \pm 1,5 \mu\text{m}$) son significativamente menores ($p < 0,01$) que las del intercostal externo ($41,0 \pm 1,5 \mu\text{m}$) (tabla I).

Es necesario aclarar en este punto que los valores medios del diámetro menor de las fibras tipo I y II, referidos en este trabajo, sólo sirven de referencia para trabajos similares que se realicen en animales de esta misma raza y en tejido muscular preservado en parafina. Las mediciones morfométricas de los músculos realizadas en tejido preservado en O.C.T. pueden variar significativamente con relación a las descritas en este trabajo.

Los valores porcentuales de fibras híbridas de los músculos estudiados no difieren significativamente entre sí en ningún caso. Estos valores se mantienen inferiores a un 2% de fibras híbridas en condiciones basales en todos los músculos estudiados (tabla I).

El porcentaje inicial de fibras dañadas analizadas por la técnica de detección de fibronectina intracelular no supera el 2% en ninguno de los músculos estudiados. Sin embargo, en el músculo intercostal externo es donde se encuentran los valores iniciales más bajos de daño ($0,2\% \pm 0,1$) como se puede apreciar en la tabla I. El daño presente en este músculo es significativamente menor ($p < 0,01$) que el encontrado en los otros músculos estudiados ($1,3\% \pm 0,5$ diafragma y $1,2\% \pm 0,4$ vasto interno).

5,2,2- Resultados globales de la aplicación de cargas resistivas.

El estudio en su totalidad contó con la instrumentalización de 14 animales agrupados de la siguiente forma: 11 animales se incluyeron en el grupo estudio (con aplicación de cargas inspiratorias resistivas) y 3 animales en el grupo control (sin aplicación de cargas

inspiratorias resistivas). A todos los animales se les practicó una primera biopsia (1ª BIOPSIA) de los músculos intercostal externo, diafragma y vasto interno el primer día, antes de realizar la traqueostomía. Y, una segunda biopsia (2ª BIOPSIA) de los mismos músculos el día quince de haber iniciado el protocolo experimental de cargas inspiratorias resistivas. A todos los animales se les realizó la traqueostomía.

Sin embargo, de los 11 animales incluidos en el grupo estudio, 5 murieron durante la aplicación del protocolo de cargas inspiratorias resistivas lo que representa una mortalidad de un 45%. En estos animales solamente se obtuvieron las biopsias iniciales (1ª BIOPSIA).

Los datos correspondientes a los animales que fallecieron durante la fase experimental solamente son utilizados en este trabajo para describir los valores basales en perros de la raza Beagle, y ya han sido discutidos en el apartado anterior. Estos datos se excluyeron a la hora de analizar los efectos de las cargas sobre los músculos.

5,2,3- Resultados en los animales con carga.

Los parámetros fisiopatológicos registrados a los animales durante la aplicación de las cargas inspiratorias resistivas se expresaron de la siguiente forma:

Durante los períodos de aplicación de las cargas los animales respiraban a una FR de 15 ± 3 resp/min., con un V_T de $9,0 \pm 1,3$ ml/Kg de peso. Esta cifra representa un volumen minuto (V_E) ponderado de 116 ml/kg/min. El T_I suponía $0,11 \pm 0,02$ seg, con una relación T_I / T_{TOT} de $0,52 \pm 0,02$. La presión media registrada en la tráquea de los animales resultó de aproximadamente $23,5 \pm 4,5$ cmH₂O lo que representa el 15% de la PIM, con un trabajo respiratorio total de 97 ± 26 gm-cm/Kg de peso, de los cuales 84 ± 25 gm-cm/ Kg correspondían a la inspiración.

Como se puede observar la resistencia media alcanzada en las vías aéreas en los perros del grupo estudio es de 135 ± 7 cm de H₂O / L /seg. Esta resistencia de las vías aéreas es 10 veces superior a la que mostraron los perros controles ($13,6$ cm de H₂O / L /seg). Durante la aplicación de cargas no se produjeron cambios sustanciales en la SaO₂ ni en los valores de P_{ET} CO₂.

5,2,4- Estandarización de la técnica inmunohistoquímica para determinar los tipos fibrilares.

Hasta el momento el método más utilizado en todos los trabajos publicados para la tipificación de fibras musculares ha sido el Método de ATP-asa (pH 4,2, 4,6 y 9,4). Este

método histoquímico para la tipificación fibrilar del músculo determina la actividad ATP-asa en la fibra muscular a diferentes pHs del medio. De esta forma obtiene unos patrones de tinción en las fibras que reflejan el grado de actividad ATPasa producto del tipo de metabolismo dominante (oxidativo o glicolítico) en las mismas. Esta forma de tipificación asociada al metabolismo de la fibra muscular tiene una correspondencia con el contenido predominante de isoformas de MyHC presente en cada uno de los distintos tipos de fibras. Teniendo en cuenta estas consideraciones nos propusimos diseñar en nuestro modelo experimental la determinación de los tipos de isoformas de MyHC predominante en la fibra, desarrollando para ello un protocolo inmunohistoquímico sobre la base del principio de especificidad de reconocimiento antígeno-anticuerpo.

5,2,4,1- Especificidad de los anticuerpos anti-isoformas de MyHC utilizados en el estudio.

Se utilizó una técnica de inmunotransferencia de proteínas obtenidas de homogeneizados de músculos caninos. Las proteínas caninas se separaron electroforéticamente y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (técnica de Western blot). Posteriormente, se incubaron por separado con los anticuerpos anti MyHC I y anti MyHC II, tal y como se especifica en el apartado de Materiales y Métodos. El resultado se puede observar en la figura 12 (pág. 64). Los anticuerpos comerciales utilizados en este estudio son específicos para cada isoforma de MyHC expresadas en el perro y no tienen reacción cruzada entre sí ni con otras proteínas del homogeneizado muscular.

Una vez determinada la especificidad de los anticuerpos primarios (anti MHC I y II) a utilizar en el modelo canino, estos anticuerpos se utilizaron en inmunohistoquímica para la determinación del tipaje muscular, y además, en la técnica de ELISA para la cuantificación de isoformas de MyHC I y II, en los homogeneizados celulares.

5,2,4,2- Determinación de los tipos de fibras musculares por inmunohistoquímica.

La técnica inmunohistoquímica para la determinación de tipos de fibras musculares I y II se estandarizó sobre cortes de tejidos preservados en O.C.T. y de tejidos preservados en parafina. El reconocimiento de ambos anticuerpos monoclonales primarios era correcto en los tejidos preservados en O.C.T. Sin embargo, no había reconocimiento por ninguno de los dos anticuerpos primarios en los tejidos preservados en parafina.

Este primer resultado no mejoraba mucho la expectativa que teníamos de emplear la técnica de inmunohistoquímica para tipificar las fibras musculares. Ya hemos explicado

anteriormente los inconvenientes que presentan las determinaciones realizadas en tejido preservado en O.C.T.. En la mayoría de los casos las fibras presentan un aspecto vacuolado y una deformación parcial de la morfología fibrilar. Estas características se pueden apreciar en la Figura 7 (pág. 43). En esta figura se encuentra digitalizado el tejido para las técnicas de determinación de Proción orange y fibronectina, y la técnica está realizada en tejido preservado en O.C.T..

Se llevó a cabo un nuevo intento de reconocimiento con los anticuerpos anti MyHC I y II en el tejido preservado en parafina. Para ello introdujimos una modificación del protocolo original que fue la siguiente: Se trataron los cortes de tejido con PBS ácido cítrico y calor para mejorar la exposición antigénica del tejido.

El resultado de esta modificación al procedimiento inicial fue correcto. El tratamiento previo del tejido con ácido cítrico hirviendo permitió una adecuada exposición de los epítomos de las isoformas de MyHC y éstas proteínas son reconocidas por los anticuerpos primarios. De esta forma se realizó el tipaje de las fibras musculares utilizando los anticuerpos monoclonales específicos para cada una de la isoformas de MyHC (figura 9. pág. 54).

El tejido preservado en parafina conserva mejor la morfología de las fibras, no presentan vacuolaciones internas ni deformación de los contornos de la fibras. Por otra parte, se obtiene como resultado una tinción de todo o nada, donde no existe duda por parte del observador a la hora de definir una fibra como positiva o negativa. Estas características se pueden apreciar en la figura 9 (pág. 54).

La técnica inmunohistoquímica para la determinación de tipos fibrilares quedó estandarizada según la metodología que se expone en el apartado de Materiales y Métodos.

5,2,5- Tipificación de fibras musculares en el modelo experimental.

Los resultados experimentales de todos los animales obtenidos en el modelo experimental con la técnica de tipificación inmunohistoquímica de fibras musculares se expresan en las tablas II, III y IV, y en las figuras 16a), b) y c) para cada uno de los músculos estudiados. Estos valores están reflejados antes y después de la aplicación de las cargas inspiratorias resistivas.

Como muestran los datos reflejados en las tablas II, III y IV en los animales del grupo control no hay variaciones en cuanto a los valores obtenidos del tipaje fibrilar entre la 1ª y 2ª

TABLA VIII Valores de MyHC y II, en 20 µg de proteínas totales y porcentajes relativos de MyHC I y II en el homogenizado de músculo obtenidos antes (1ª BIOPSIA) y después (2ª BIOPSIA) de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas, en el músculo vasto interno.

G.E.	ANIMAL	1ª BIOPSIA			2ª BIOPSIA		
		MyHC I ¹ (µg)	MyHC I ¹ (%)	MyHC I ² (%)	MyHC I ¹ (µg)	MyHC I ² (%)	MyHC I ² (%)
	1	2,5	4,9	52,3	0,1	2,5	43,5
	2	nd.	nd.	80,4	nd.	nd.	nd.
	3	nd.	nd.	86,0	nd.	nd.	nd.
	4	nd.	nd.	88,0	nd.	nd.	nd.
	5	4,3	2,6	70,2	0,9	2,4	61,7
	6	6,6	4,7	68,3	2,0	2,4	59,8
	7	2,3	2,3	72,0	1,9	1,9	71,7
	8	1,5	4,9	52,0	1,1	2,5	60,0
	9	nd.	nd.	71,8	nd.	nd.	nd.
	10	nd.	nd.	79,0	nd.	nd.	nd.
	11	4,3	2,6	62,3	1,9	2,4	66,8
	medias. (p<1%)			71,3 ± 5			65,5
	media ± es. (p=6)	3,6 ± 1	3,7 ± 0,5	66,1 ± 5	1,4 ± 0,3 ^a	2,4 ± 0,2 ^a	63,9 ± 5 ^{ab}
	G.C.	3,6	4,7	79,3	3,7	4,7	72,6
	13	3,3	2,3	65,3	3,3	2,2	47,0
	14	3,3	2,3	78,6	3,3	2,3	60,1
	media ± es. (p=9)	3,4 ± 0,1	3,1 ± 0,1	74,4 ± 4	3,4 ± 0,1 ^{ab}	3,1 ± 1 ^{ab}	66,6 ± 10 ^{ab}
							33,2 ± 10 ^{ab}

(1) Los valores de MyHC I¹ fueron aditivos a 20 µg de proteínas totales obtenidos por la técnica de B.S.A.

(2) Los porcentajes de MyHC I² fueron obtenidos por el método de la proteína de referencia de la técnica de B.S.A.

nd. valor no determinado. n.s. comparación no significativa por la Prueba de Wilcoxon.

Prueba de Wilcoxon. Significación (1) p<0,05; (2) n.s. no significativo.

es. error estándar de la media

G.E. Grupo Clínico.

G.C. Grupo Control.

TABLA III Tipo y morfometría de las fibras musculares antes (1^a BIOPSiA) y después (2^a BIOPSiA) de la aplicación de las cargas inspiratorias resistivas, en el músculo diafragma.

ANIMAL	1 ^a BIOPSiA				2 ^a BIOPSiA			
	FI (µ)	FI (N)	FII (N)	DefII (µm)	FI (N)	FII (N)	F. Híbridas (N)	DefII (µm)
G.E. 1	57,8	429	0,0	44,7	58,8	47,2	6,0	25,4
2	53,9	490	0,0	25,5
3	64,3	398	0,0	32,2
4	32,5	672	0,0	28,8
5	55,3	522	7,5	40,3	58,7	37,7	0,0	30,4
6	61,6	474	0,0	36,9	50,3	46,3	0,0	27,7
7	55,9	496	2,5	27,4	53,6	52,7	6,3	28,6
8	57,1	558	12,9	38,3	52,1	47,3	0,0	36,1
9	52,7	50,7	3,4	28,7
10	82,4	87	0,0	28,4	65,0	430	6,0	31,4
11	66,6	398	0,0	31,1
media ± es. (n=11)	57,5 ± 3	447 ± 3	2,4 ± 5	33,5 ± 2	56,1 ± 2	45,4 ± 2	3,4 ± 1 ^{na}	30,1 ± 1 ^o
media ± es. (n=6)	57,7 ± 2	459 ± 3	3,8 ± 2	37,2 ± 2	31,0 ± 2 ^o
G.C. 12	62,5	354	0,0	28,0	46,1	40,3	0,0	34,2
13	60,0	900	0,0	26,2	46,4	46,7	0,0	28,0
14	44,1	480	0,0	27,2	47,6	48,2	0,0	37,4
media ± es. (n=3)	52,2 ± 5	445 ± 4	0,0	26,1 ± 0,5	47,4 ± 1 ^{na}	49,1 ± 0,2 ^{na}	0,0 ^{na}	32,5 ± 3 ^{na}

Fi y Fii - potenciales obtenidos por inmunohistoquímica para la aplicación de fibras musculares.

DefII y Fii - valores medios del diámetro morfológico de las fibras (µm).

Fibras híbridas con función postural pasiva en los grupos de animales G.E.

Valores medios ± es. a. (para cada grupo de animales).

Pruebas de Wilcoxon. Significación (p < 0,05) (n.s.) no significativo.

G.E. Grupo Estudio

G.C. Grupo Control.

TABLA IV Tipaje y morfometría de las fibras musculares antes (1^o BIOPESIA) y después (2^o BIOPESIA) de la aplicación de las cargas inspiratorias resistivas, en el músculo vasto lateral.

ANIMAL	1 ^o BIOPESIA				2 ^o BIOPESIA			
	FI (%)	FI (%)	F. Híbridas (%)	DefFI (%)	FI (%)	FI (%)	F. Híbridas (%)	DefFI (%)
G.E. 1	90,5	42,7	2,2	43,1	56,2	57,0	11,0	25,7
2	81,4	36,5	0,0	27,6
3	81,1	18,8	0,0	46,4
4	67,4	32,5	0,0	28,3
5	70,5	26,0	5,0	30,5	78,1	62,5	61,0	23,4
6	57,7	40,0	0,0	25,7	72,7	56,0	24,0	26,3
7	72,2	35,5	7,7	38,3	71,6	67,0	38,0	20,6
8	71,3	32,7	4,0	36,1	77,1	61,0	37,0	30,8
9	60,2	33,0	3,0	32,5
10	76,2	26,0	4,2	38,7
11	77,1	23,1	0,2	36,6	78,0	63,0	30,0	30,5
media ± es. (n=11)	69,8 ± 3	32,6 ± 3	1,6 ± 1	34,2 ± 2	71,6 ± 4 ^{ms}	64,2 ± 4 ^r	35,9 ± 7 ^r	26,6 ± 2 ^r
media ± es. (n=6)	69,5 ± 4	35,0 ± 3	2,3 ± 1	34,9 ± 2	25,3 ± 2 ^{ms}
G.C. 12	65,4	40,0	5,4	33,2	60,7	41,5	1,0	36,7
13	63,6	35,0	0,0	34,3	59,3	45,0	4,0	30,4
14	67,6	32,9	0,5	34,8	62,2	38,8	0,0	35,4
media ± es. (n=3)	68,8 ± 3	33,6 ± 2	1,9 ± 2	34,1 ± 0,4	60,7 ± 1 ^{ms}	42,1 ± 2 ^{ms}	1,6 ± 1 ^{ms}	34,2 ± 21 ^{ms}
								35,0 ± 2 ^{ms}

FI y FI_h - porcentajes obtenidos por inmunohistoquímica para la identificación de fibras musculares.
 DefFI y FI_h - valores medios del diámetro muscular (en micras).
 F. Híbrid - fibras con tinción positiva para ambos tipos de fibras esportivas (MHC).
 Valores medios ± e.s. (para cada fibra de la muestra).
 Pruebas de Wilcoxon. Significación (*) p < 0,05 y (ms) no significativo.
 G.E. Grupo Ejercicio
 G.C. Grupo Control.

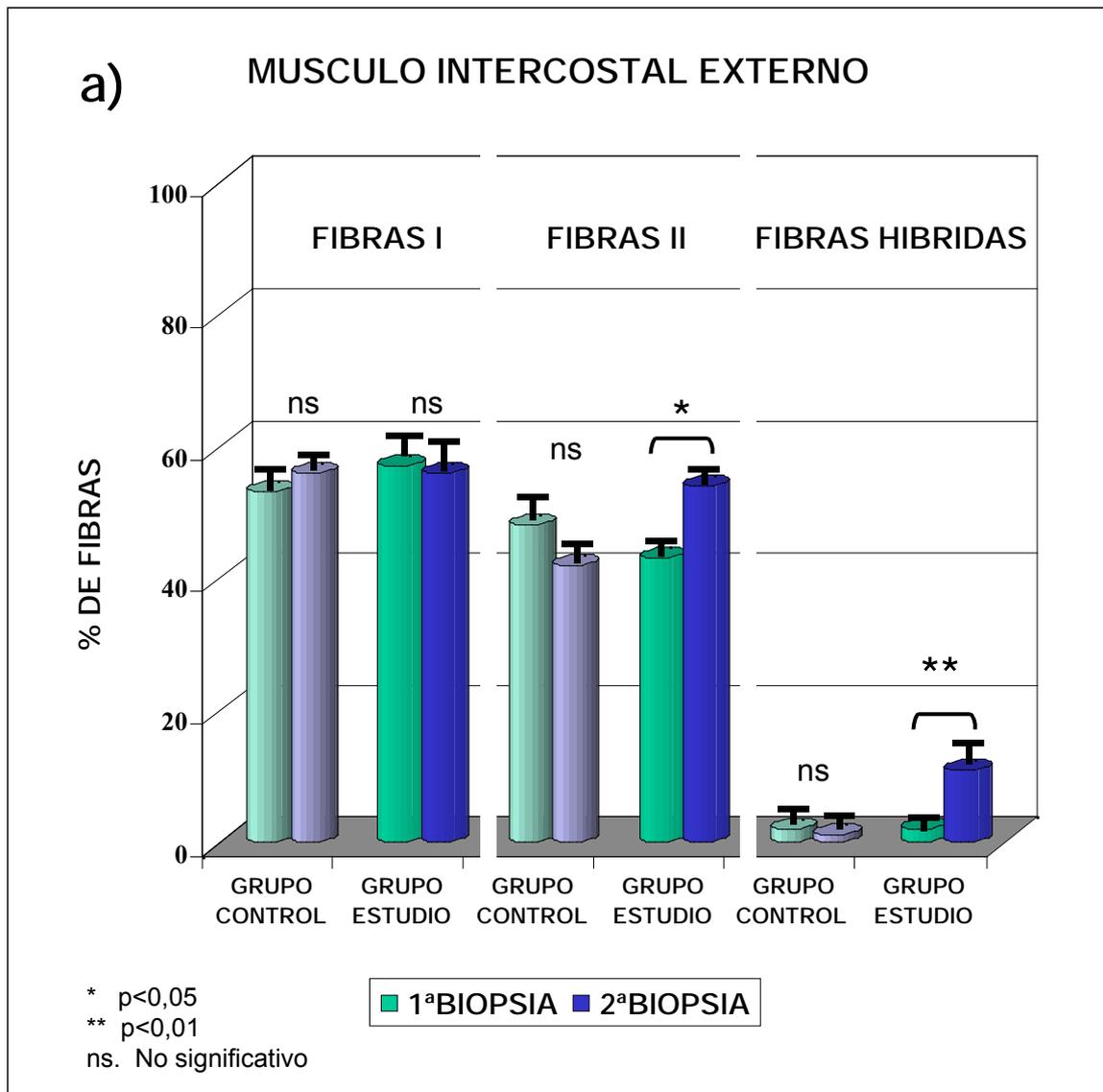


Figura 16. a) Histograma. Valores de % de fibras I, II e híbridas, obtenidos antes y después de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas en el músculo intercostal externo.

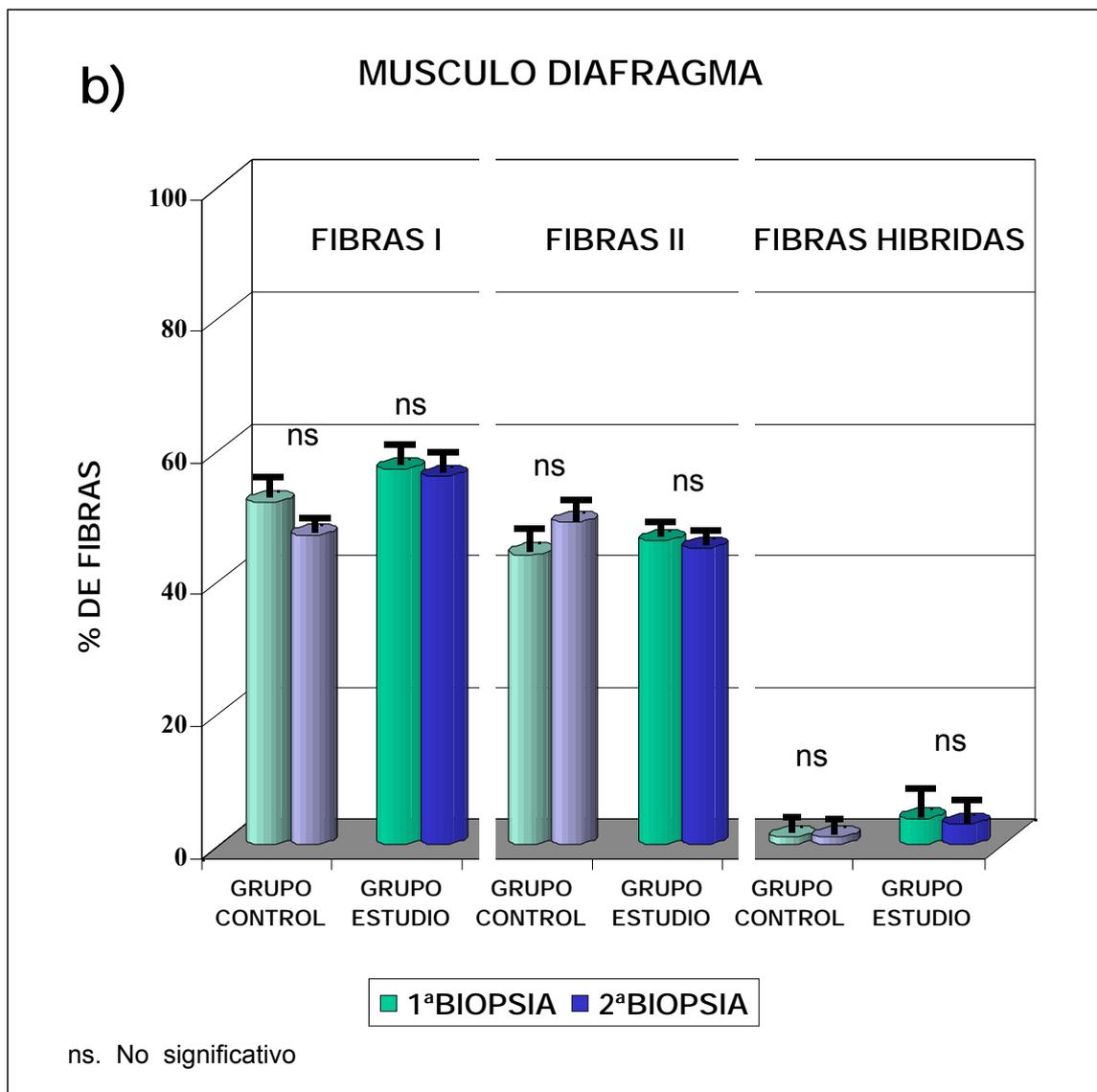


Figura 16. b) Histograma. Valores de % de fibras I, II e híbridas, obtenidos antes y después de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas en el músculo diafragma.

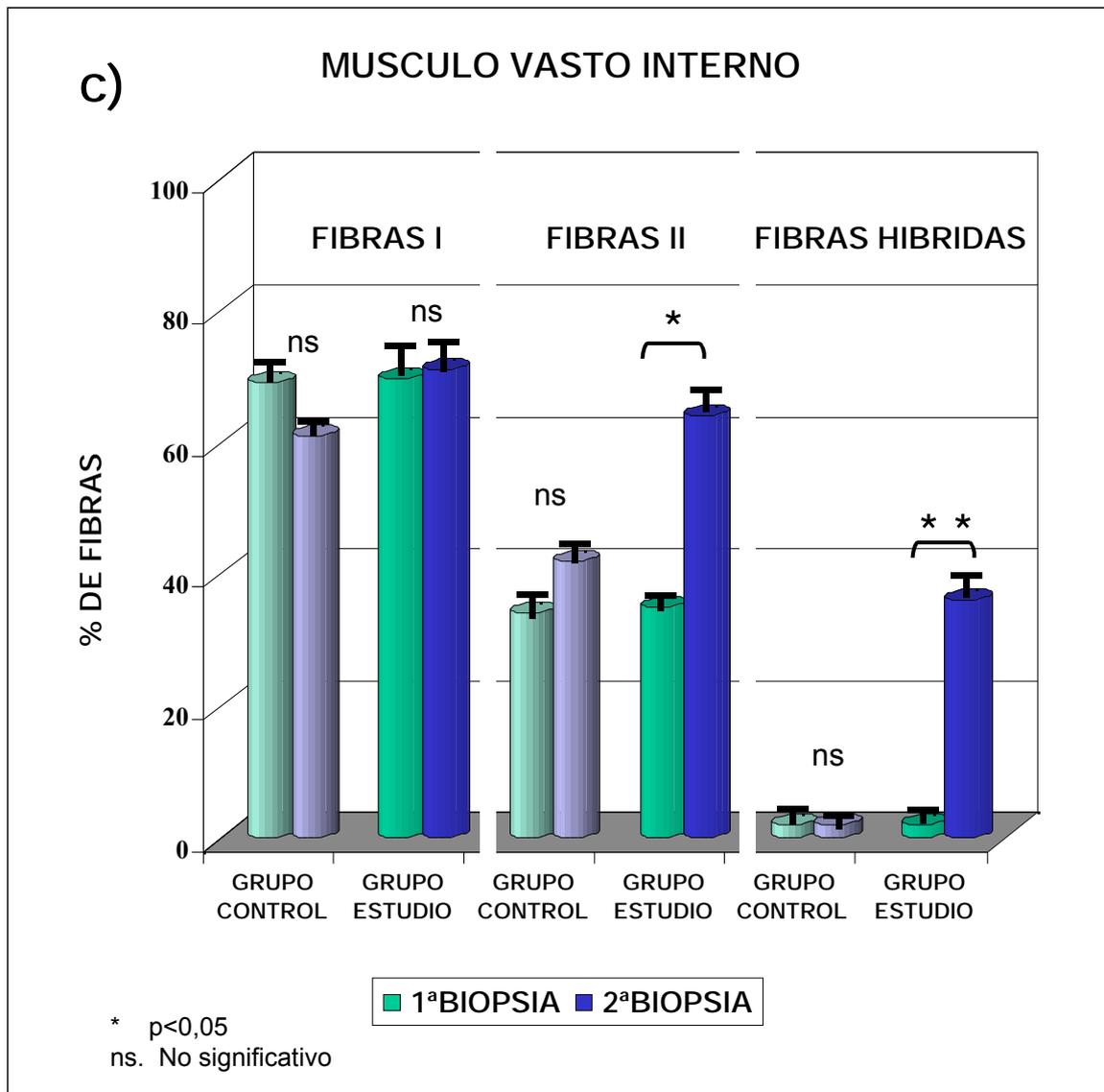


Figura 16. c) Histograma. Valores de % de fibras I, II e híbridas, obtenidos antes y después de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas en el músculo vasto interno.

BIOPSIA. Sin embargo, en el grupo estudio se evidencia un aumento de las fibras tipo II en los músculos intercostal externo ($42,8\% \pm 2$ vs $54,5\% \pm 1$) y vasto interno ($35,0\% \pm 3$ vs $64,2\% \pm 4$) después de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas; pero no se evidencian cambios de estas fibras en el diafragma ($45,9\% \pm 3$ vs $45,4\% \pm 2$). Las fibras I no expresan diferencias significativas después de la aplicación de las cargas en ninguno de los músculos estudiados en este grupo.

Ahora bien, estos resultados se complementan si al realizar el análisis descontamos a cada uno de los tipos de fibras el valor de las fibras híbridas obtenido, entonces hablamos en término de fibras I o II “puras” y se refleja lo siguiente. En el grupo control no existen cambios significativos entre la 1ª y 2ª BIOPSIA para ninguno de los porcentajes de fibras “puras”. En el grupo de estudio, se aprecia una disminución significativa de las fibras I “puras” en los músculos intercostal externo ($54,7\%$ vs $44,8\%$) y en el vasto interno ($67,2\%$ a $35,7\%$), sin embargo no se encuentran diferencias significativas en el diafragma para estas mismas fibras. Por otro lado, las fibras II “puras” no varían significativamente en ninguno de los músculos estudiados.

5,2,6- Tamaño de las fibras musculares.

Los valores individuales y medios obtenidos del diámetro menor, que representa el tamaño de la fibra, por tipo de fibra muscular en los músculos estudiados de los animales de ambos grupos experimentales están detallados en las tablas II, III y IV, y en las figuras 17a), b) y c). Los valores medios del diámetro menor obtenidos en todos los músculos estudiados para ambos tipos de fibras musculares están reflejados en las mismas tablas atendiendo a los grupos experimentales.

El grupo control no muestra diferencias de los valores medios del diámetro menor entre la 1ª y 2ª BIOPSIA, en ningún músculo estudiado ni en ninguno de los tipos de fibras musculares.

Con relación al grupo estudio, encontramos una disminución significativa del tamaño de las fibras en el músculo diafragma para los dos tipos de fibras musculares ($37,2\mu\text{m} \pm 2$ vs $30,1\mu\text{m} \pm 1$, tipo I y $34,5\mu\text{m} \pm 1$ vs $31,0\mu\text{m} \pm 2$, tipo II). En el músculo vasto interno disminuye significativamente el tamaño en las fibras tipo I ($34,9\mu\text{m} \pm 2$ vs $26,6\mu\text{m} \pm 2$), con una tendencia similar de las tipo II ($p=0,06$). En el músculo intercostal externo no se aprecia cambio significativo alguno.

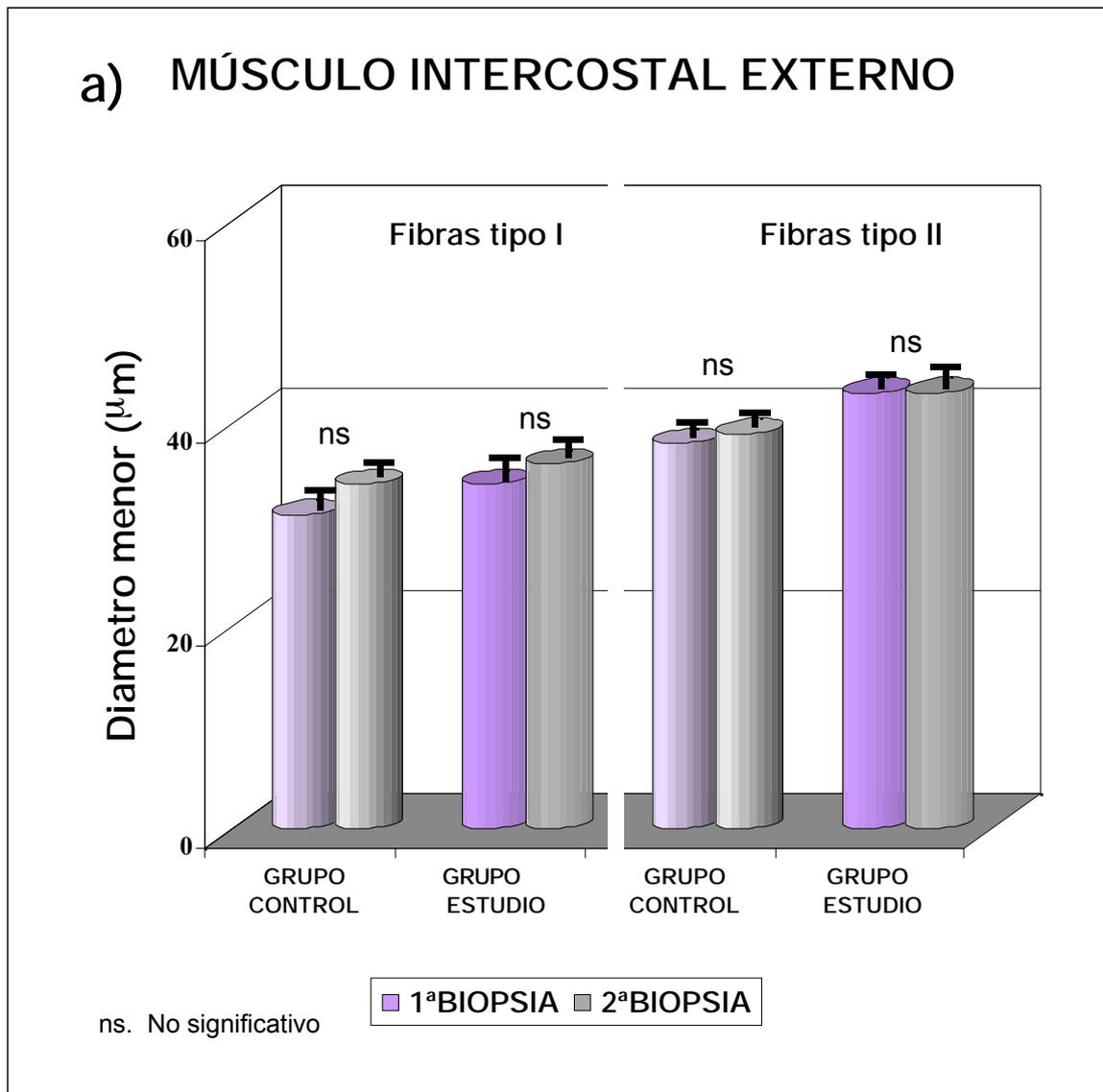


Figura 17. a) Histograma. Valores relacionados con el diámetro menor de las fibras I y II, obtenidos antes y después de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas en el músculo intercostal externo.

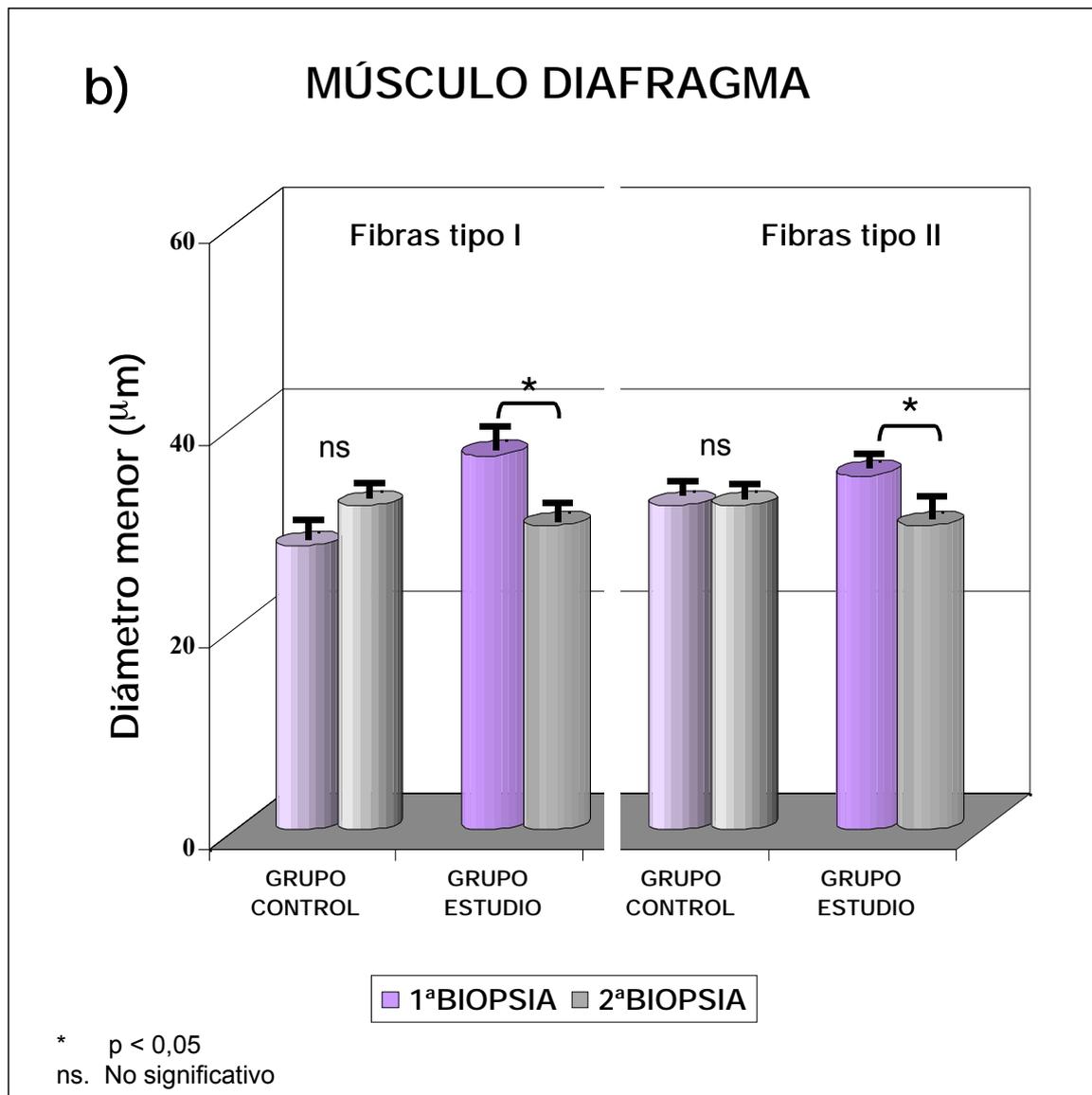


Figura 17. b) Histograma. Valores relacionados con el diámetro menor de las fibras I y II, obtenidos antes y después de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas en el músculo diafragma.

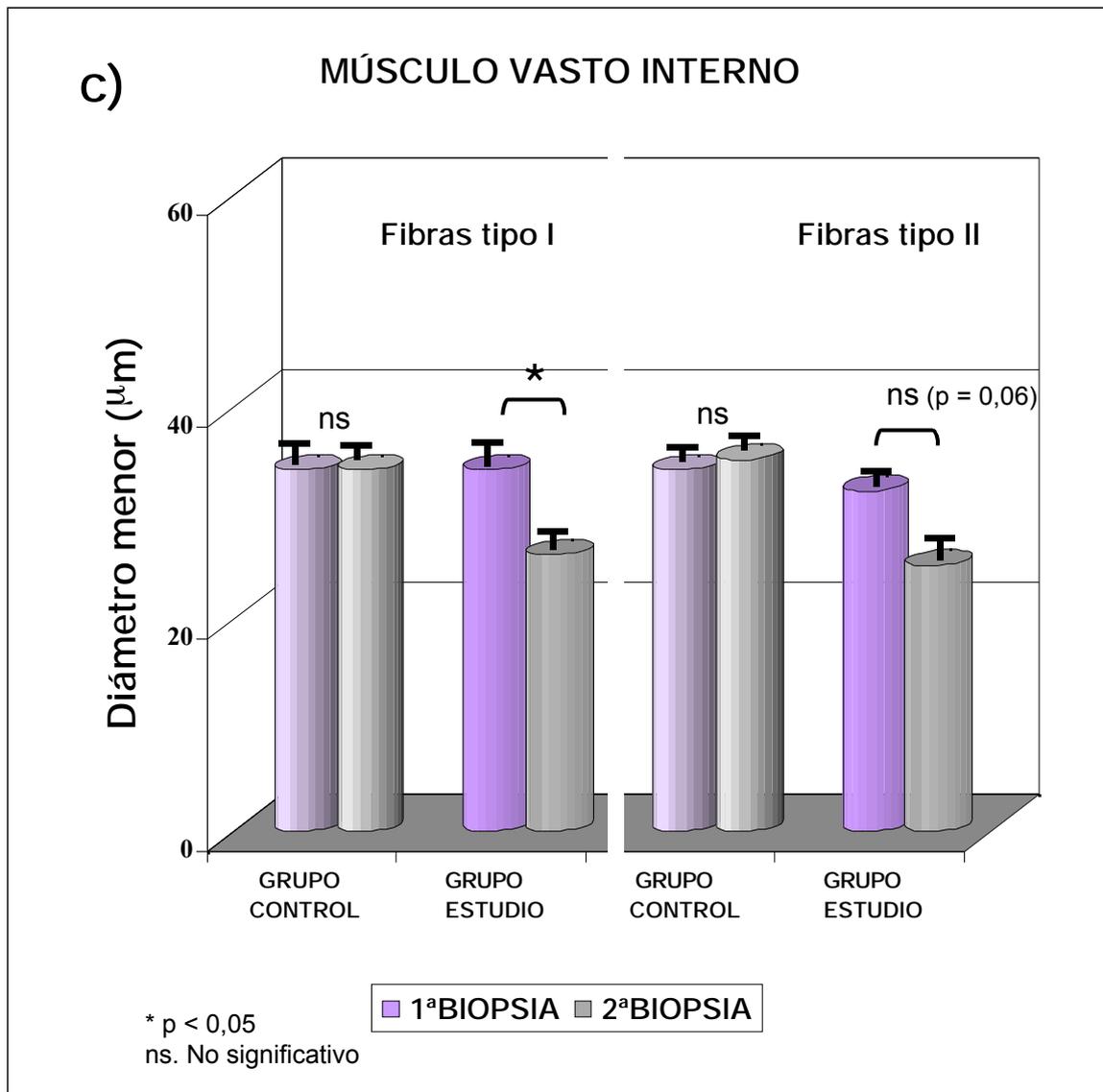


Figura 17. c) Histograma. Valores relacionados con el diámetro menor de las fibras I y II, obtenidos antes y después de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas en el músculo vasto interno.

5,2,7- Porcentaje relativo y cuantificación de isoformas de MyHC en el tejido muscular.

El método de inmunocuantificación de isoformas de MyHC, ELISA, desarrollado en este trabajo está descrito básicamente en el trabajo realizado por Lepp y Martínez (1989). Hemos respetado todas las condiciones experimentales del mismo a la hora de utilizar este protocolo en nuestro estudio. Por otro lado, no hizo falta volver a probar la especificidad de los anticuerpos primarios para las isoformas de MyHC, porque ya lo habíamos realizado en la técnica de inmunodetección y se utilizaron los mismos anticuerpos primarios.

La cuantificación aproximada de cada una de las isoformas de MyHC en los homogeneizados celulares fue posible por dos razones. Primero, se ajustó la concentración de proteína de todas las muestras de homogeneizados de músculos incluidos en nuestro estudio a 200 µg/ml, utilizando para ello el método de determinación de proteínas totales de Bradford, se adicionó en cada pocillo una cantidad de 20 µg de proteínas totales. Segundo, se confeccionó en cada placa de 96 pocillos una curva de concentraciones conocidas de proteína de albúmina de suero bovino. Esta curva de concentraciones conocidas nos permitió establecer los cálculos para cuantificar las isoformas de MyHC presentes en cada uno de los homogeneizados de proteínas musculares analizados.

Como resultado del desarrollo del ELISA para la determinación de la concentración de isoformas de MyHC se determinan las cantidades relativas, en µg, de isoformas de MyHC presentes en 20 µg de proteínas totales del homogeneizado.

Los valores obtenidos sólo nos permiten analizar los datos comparando los resultados obtenidos en la misma isoforma de MyHC antes y después de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas entre los animales estudiados o, entre los valores obtenidos por la misma isoforma en diferentes animales en un mismo estadio. Sin embargo, no permite comparar los valores obtenidos entre las distintas isoformas de MyHC. Esta limitación se debe a que las afinidades de los anticuerpos utilizados son diferentes para las distintas isoformas de MyHC.

Esta técnica solamente se realizó con las muestras de los animales que tenían 1ª y 2ª BIOPSIA, y los valores obtenidos están reflejados en las tablas V, VI y VII, y en las figuras 18a), b) y c); los valores medios obtenidos de la cuantificación de MyHC I y II en los animales del grupo estudio y del grupo control están también reflejados en estas mismas tablas, correspondientes a los tres músculos estudiados.

TABLA V Valores de MyHC y II, en 20 µg de proteínas totales y porcentajes relativos de MyHC I y II en el homogenizado de músculo obtenidos antes (1ª BIOPSIA) y después (2ª BIOPSIA) de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas, en el músculo intercostal externo.

ANIMAL	1ª BIOPSIA			2ª BIOPSIA		
	MyHC I ¹ (µg)	MyHC II ¹ (µg)	MyHC I ¹ (%)	MyHC I ² (µg)	MyHC II ² (µg)	MyHC I ² (%)
G.E. 1	45	28	68,5	3,4	3,5	51,2
2	nd.	nd.	60,0	nd.	nd.	nd.
3	nd.	nd.	60,8	38,1	nd.	nd.
4	nd.	nd.	50,8	48,4	nd.	nd.
5	2,1	2,8	42,5	52,5	2,3	44,9
6	1,5	3,5	42,8	52,4	3,5	53,1
7	2,0	4,2	47,9	52,1	2,6	37,6
8	4,8	2,8	36,9	64,1	3,4	62,2
9	nd.	nd.	50,0	50,0	nd.	nd.
10	nd.	nd.	60,1	38,1	nd.	nd.
11	2,1	2,7	70,6	38,8	2,3	38,2
medias. (p<1%)			54,5 ± 5			
media ± e.s. (n=6)	2,7 ± 0,5	3,1 ± 0,2	53,0 ± 5	46,8 ± 5	0,7 ± 0,1 ^{1a}	51,9 ± 5 ^{2a}
G.C. 12	2,5	3,5	68,4	36,1	3,5	54,1
13	2,0	3,4	58,7	38,4	3,6	38,0
14	2,0	3,2	38,4	60,6	3,2	47,2
media ± e.s. (n=3)	2,2 ± 0,1	3,4 ± 0,1	53,8 ± 7	45,4 ± 8	2,2 ± 0,1 ^{1a}	51,7 ± 5 ^{2a}

[1] Los valores de MyHC I y II están expresados en 20 µg de proteínas totales obtenidas por la técnica de BSA.

[2] Los porcentajes de MyHC I y II están obtenidos por el cociente de los homogenizados de músculo nd. valor no determinado.

Puntado Wilcoxon. Significativo (*) p<0,05 y (ns) no significativo.

n.s. error estándar de la media.

G.E. Grupo Control.

G.C. Grupo Control.

TABLA VI Valores de MyHC (y II, en 20 µg) de proteínas totales y porcentajes relativos de MyHC I y II en el homogenizado de músculo obtenidos antes (1ª BIOPSIA) y después (2ª BIOPSIA) de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas, en el músculo diafragma.

ANIMAL	1ª BIOPSIA			2ª BIOPSIA		
	MyHC I ¹ (µg)	MyHC I ² (µg)	MyHC I ² (%)	MyHC I ¹ (µg)	MyHC I ² (µg)	MyHC I ² (%)
G.E. 1	1,7	3,0	27,9	1,2	5,5	65,3
2	nd.	nd.	70,0	nd.	nd.	nd.
3	nd.	nd.	7,0	nd.	nd.	nd.
4	nd.	nd.	80,4	nd.	nd.	nd.
5	1,8	6,5	48,8	0,5	2,7	80,7
6	1,5	4,3	58,8	2,4	7,8	54,5
7	1,3	2,9	66,5	1,3	3,2	40,6
8	1,7	2,9	58,6	1,2	5,5	64,4
9	nd.	nd.	67,7	nd.	nd.	nd.
10	nd.	nd.	49,0	nd.	nd.	nd.
11	1,6	6,3	82,0	1,5	2,6	79,3
media ± esd (n=6)	1,6 ± 1	4,3 ± 1	55,0 ± 7	1,4 ± 0,2 ¹	4,5 ± 0,8 ²	62,3 ± 4 ^{2a}
G.C. 12	1,5	4,3	46,5	1,5	4,5	54,7
13	1,3	2,9	49,2	1,5	2,6	51,7
14	1,4	2,6	58,6	1,4	2,4	48,0
media ± esd (n=3)	1,4 ± 0,04	3,3 ± 0,5	50,1 ± 3	1,5 ± 0,04 ¹	3,2 ± 0,7 ^{2a}	51,5 ± 2 ^{2a}

[1] Los valores de MyHC I¹ fueron obtenidos por la técnica de B.S.A.

[2] Los porcentajes de MyHC I² fueron obtenidos por el método de los homogenizados de músculo.

nd. valor no determinado.

n.s. comparación no significativa por la Prueba de Wilcoxon.

es. error estándar de la media.

G.E. Grupo Control.

G.C. Grupo Control.

TABLA VIII Valores de MyHC I y II, en 20 µg de proteínas totales y porcentajes relativos de MyHC I y II en el homogenizado de músculo obtenidos antes (1ª BIOPSIA) y después (2ª BIOPSIA) de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas, en el músculo vasto interno.

G.E.	ANIMAL	1ª BIOPSIA			2ª BIOPSIA		
		MyHC I ¹ (µg)	MyHC I ¹ (%)	MyHC I ² (%)	MyHC I ¹ (µg)	MyHC I ² (%)	MyHC I ² (%)
	1	2,5	4,9	52,3	0,1	2,5	43,5
	2	nd.	nd.	80,4	nd.	nd.	nd.
	3	nd.	nd.	86,0	nd.	nd.	nd.
	4	nd.	nd.	88,0	nd.	nd.	nd.
	5	4,3	2,6	70,2	0,9	2,4	61,7
	6	6,6	4,7	68,3	2,0	2,4	59,8
	7	2,3	2,3	72,0	1,9	1,9	71,7
	8	1,5	4,8	52,0	1,1	2,5	60,0
	9	nd.	nd.	71,8	nd.	nd.	nd.
	10	nd.	nd.	79,0	nd.	nd.	nd.
	11	4,3	2,6	62,3	1,9	2,4	66,8
	medias. (p<1%)			71,3±5			65,5
	media ± es. (p=6)	3,6 ± 1	3,7 ± 0,5	66,1 ± 5	1,4 ± 0,3 ^a	2,4 ± 0,2 ^a	63,9 ± 5 ^{ab}
	G.C.	3,6	4,7	78,3	3,7	4,7	72,6
	13	3,3	2,3	65,3	3,3	2,2	47,0
	14	3,3	2,3	78,6	3,3	2,3	60,1
	media ± es. (p=3)	3,4 ± 0,1	3,1 ± 0,1	74,4 ± 4	3,4 ± 0,1 ^{ab}	3,1 ± 1 ^{ab}	66,6 ± 10 ^{ab}
							33,2 ± 10 ^{ab}

[1] Los valores de MyHC I y II están expresados en 20 µg de proteínas totales obtenidos por la técnica de B.S.A.

[2] Los porcentajes de MyHC I y II están obtenidos por el método de la proteína total de la muestra de músculo.

nd. valor no determinado. n.s. comparación no significativa por la Prueba de Wilcoxon.

Prueba de Wilcoxon. Significación [1] p<0,05 y [2] no significativo.

es. error estándar de la media

G.E. Grupo Clínico.

G.C. Grupo Control.

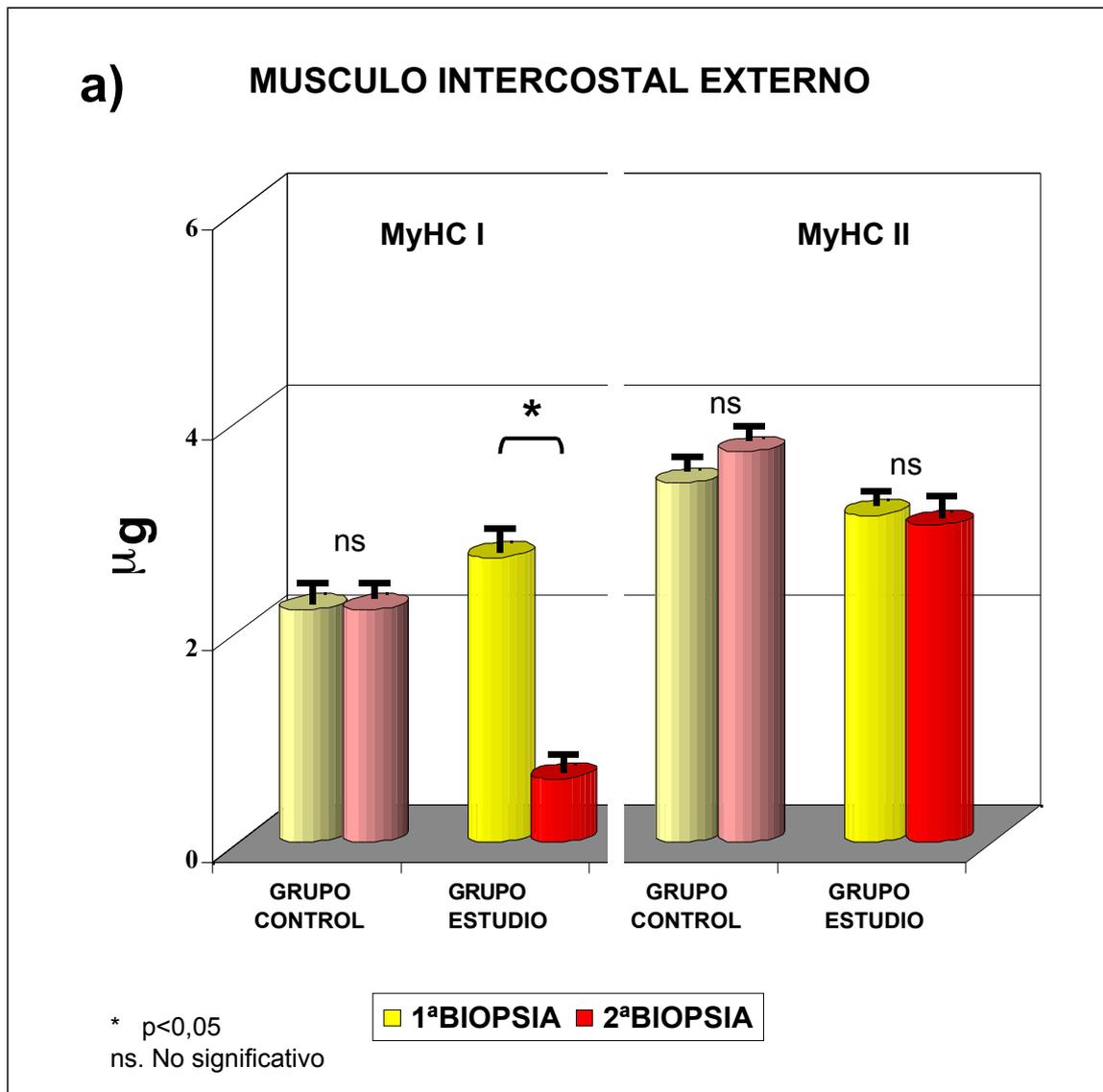


Figura 18. a) Histograma. Valores relacionados con la cantidad de MyHC I y II en 20 µg de proteínas totales, obtenidos antes y después de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas en el músculo intercostal externo.

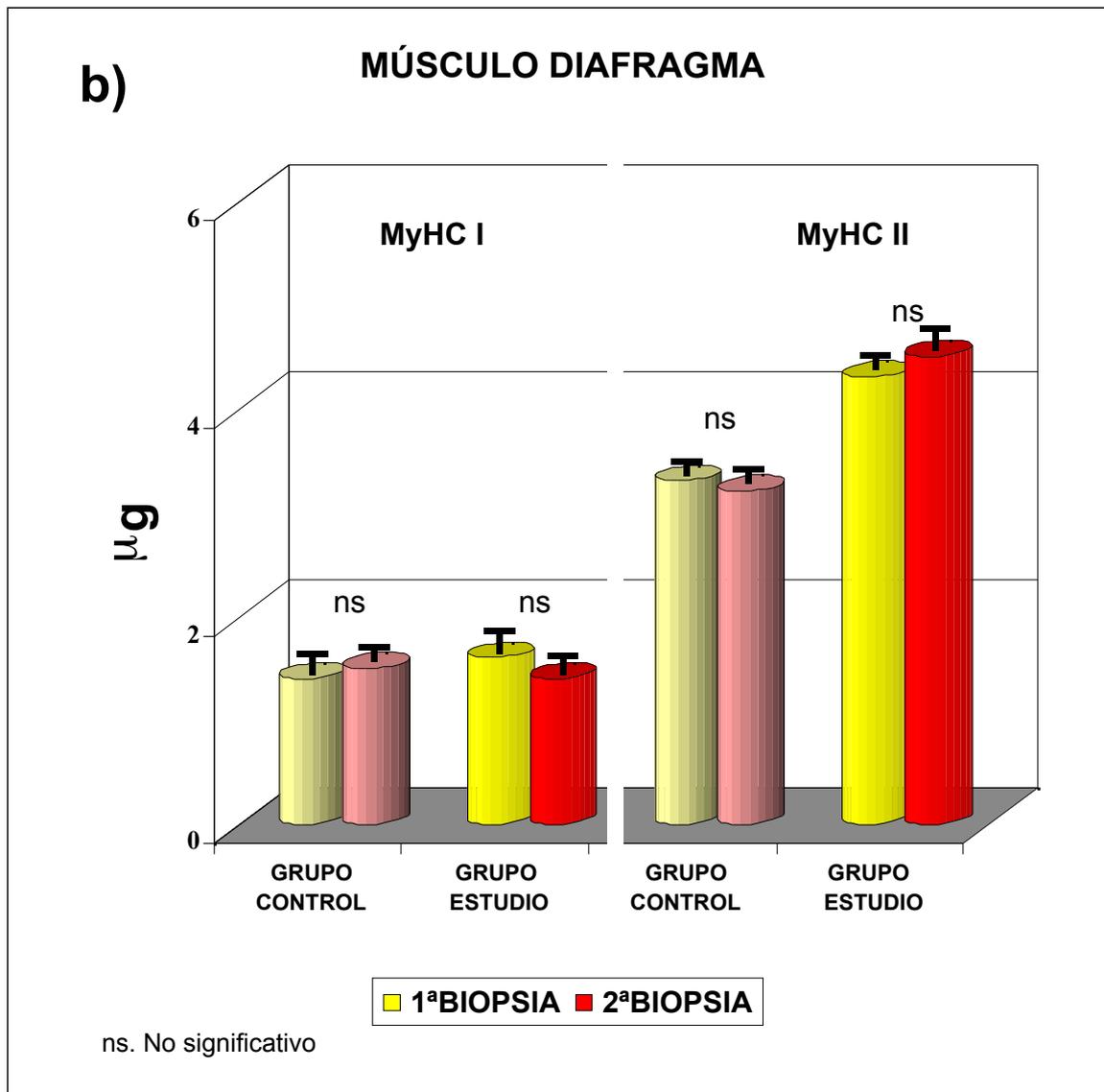


Figura 18. b) Histograma. Valores relacionados con la cantidad de MyHC I y II en 20 μg de proteínas totales, obtenidos antes y después de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas en el músculo diafragma.

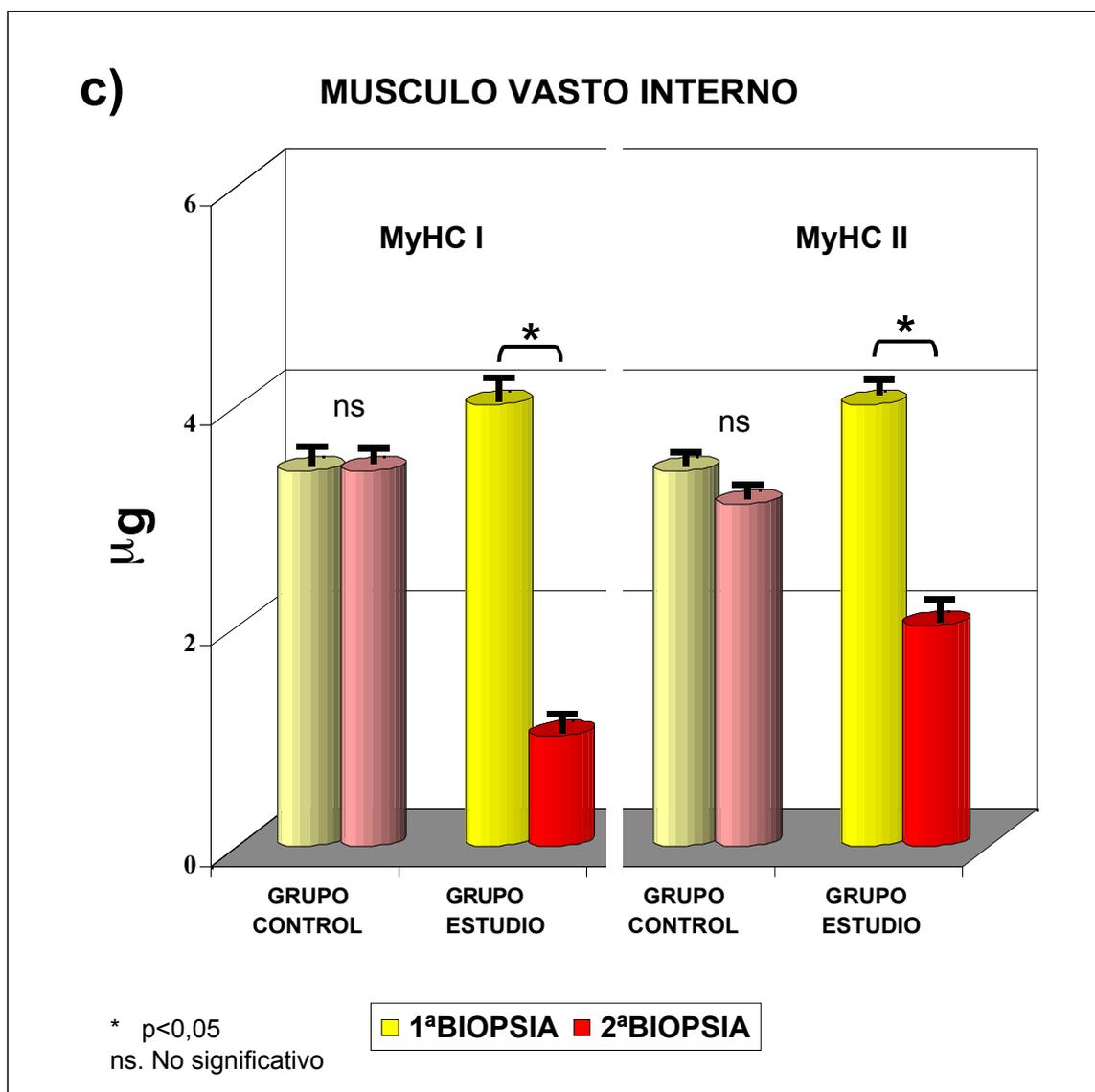


Figura 18. c) Histograma. Valores relacionados con la cantidad de MyHC I y II en $20 \mu\text{g}$ de proteínas totales, obtenidos antes y después de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas en el músculo intercostal externo.

La MyHC I disminuyó en el músculo intercostal externo ($2,7 \mu\text{g} \pm 0,5$ vs $0,7\mu\text{g} \pm 0,1$) y en el músculo vasto interno ($3,6\mu\text{g} \pm 1$ vs $1,4\mu\text{g} \pm 0,3$), en los animales del grupo estudio. Sin embargo, los valores obtenidos en el diafragma no se modificaron.

La isoforma de MyHC II no mostró diferencias significativas después de la aplicación de las cargas en los músculos intercostal externo y diafragma, aunque disminuyó significativamente en el músculo vasto interno. En los animales del grupo control no se encontraron diferencias entre los valores iniciales y finales para ambas isoformas de MyHC.

La determinación de los porcentajes relativos de las isoformas de MyHC I y II por la técnica de electroforesis en los homogeneizados de fibras musculares no mostró diferencias significativas en ninguno de los músculos estudiados para ninguno de los grupos experimentales. Estos resultados se pueden observar en las tablas V, VI y VII.

5,2,8- Daño de membrana en las fibras musculares.

El protocolo de la técnica inmunohistoquímica para la detección de fibronectina intracitoplasmática ha sido el mismo que han descrito los autores Talmadge y Roy (1993) y Satta (1997). Esta técnica se ha puesto a punto en los cortes histológicos de los músculos estudiados en el modelo experimental canino (figura 19).

Los porcentajes de fibras con daño de membrana plasmática obtenidos, en cada uno de los animales, se expresan en las tablas VIII, IX y X, y en la figura 20. En estas mismas tablas se pueden observar los valores porcentuales medios del daño de membrana fibrilar encontrados en los tres músculos estudiados en la 1ª y 2ª BIOPSIA en los dos grupos experimentales.

En las tabla resumen VIII, IX y X, se puede observar que existe un aumento significativo en los porcentajes de células dañadas en los tres músculos: intercostal externo, diafragma y vasto interno ($0,0\%$ vs $13,9\% \pm 2$, $1,9\% \pm 1$ vs $16,2\% \pm 3$ y $1,7\% \pm 0,7$ vs $23,0\% \pm 4$ respectivamente) después de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas. En los animales del grupo control no se observan variaciones significativas en cuanto a los porcentajes de daño.

5,2,9- Expresión de TNF- α y IL-10 en los músculos estudiados.

El protocolo utilizado en el presente estudio para la amplificación de la expresión de TNF- y IL-10 ha sido el mismo que el utilizado por Pinelli (1999). Este protocolo fue utilizado tal y

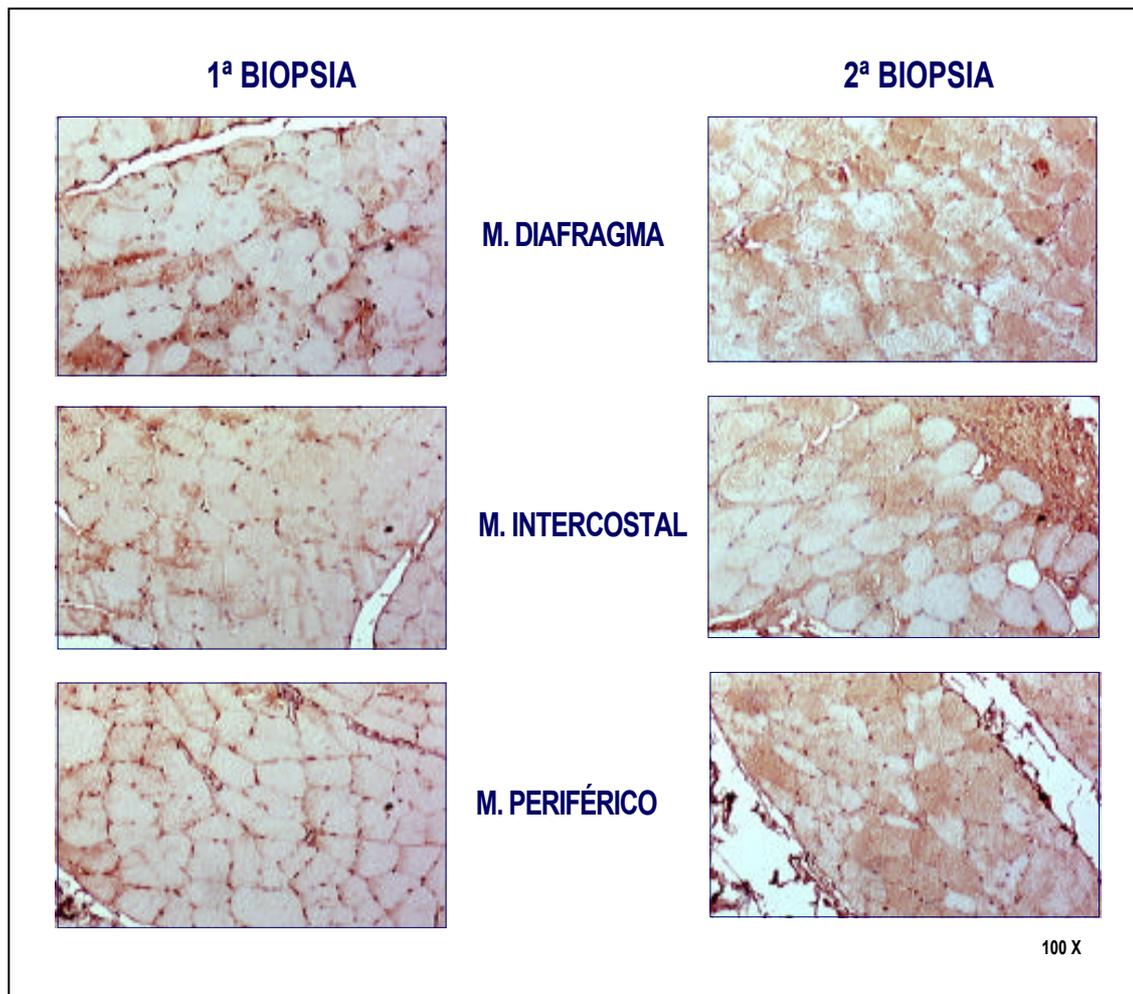


Figura 19. Tinción inmunohistoquímica para detectar acúmulos de fibronectina intracitoplasmática en las fibras con daño de membrana. Imágenes digitalizadas (100X) de los músculos intercostal externo, diafragma y vasto interno, de un animal de raza *Beagle* antes (1ª BIOPSIA) y después (2ª BIOPSIA) de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas.

TABLA VIII Porcentaje de células con daño de membrana fibrilar obtenidos antes (1^{er} BIOPSSIA) y después (2^o BIOPSSIA) de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas, en el músculo linfoconstitucional.

ANIMAL	1 ^{er} BIOPSSIA Daño de membrana (%)	2 ^o BIOPSSIA Daño de membrana (%)
G.E. 1	0,0	10,8
2	0,0	Mixto
3	0,0	Mixto
4	0,0	Mixto
5	0,0	17,6
6	0,0	6,8
7	0,0	13,9
8	0,0	17,5
9	0,0	Mixto
10	0,0	Mixto
11	0,0	7,1
media ± e.s. (n=11)	0,0	13,9 ± 2 ^o
media ± e.s. (n=6)	0,0	
G.C. 12	0,0	3,2
13	2,1	1,0
14	0,0	1,2
media ± e.s. (n=3)	1,0 ± 0,9	2,0 ± 0,7 ^o

Daño de membrana celular calculado como el porcentaje de fibras con fibroneútrófilos y plasmídeos anómalos por la técnica de inmunofluorescencia en 100 fibras.

Prueba de Wilcoxon. Significación (*) p<0,05; (ns) no significativa.

e.s. error estándar de la media

G.E. Grupo Estudio

G.C. Grupo Control.

TABLA IX. Porcentaje de células con daño de membrana fibrilar obtenidas antes (1^a BIOPSA) y después (2^a BIOPSA) de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas, en el músculo diafragma.

ANIMAL	1 ^a BIOPSA Daño de membrana [N]	2 ^a BIOPSA Daño de membrana [N]
G.E. 1	1,3	10,3
2	1,0	14,0
3	0,0	14,0
4	0,0	14,0
5	0,0	12,4
6	0,0	28,3
7	7,6	23,7
8	0,0	8,7
9	2,4	14,0
10	1,2	13,8
11	2,8	
media ± e.s. (p=11)	1,5 ± 1	
media ± e.s. (p=6)	1,9 ± 1	16,2 ± 3*
G.C. 12	1,7	1,2
13	0,0	0,7
14	0,5	0,7
media ± e.s. (p=3)	1,7 ± 0,4	1,0 ± 0,2 ^{ns}

Daño de membrana celular está calculado como el porcentaje de fibras con fibración estructuralmente alterada por la fibración muscular en 100 fibras.

Prueba de Wilcoxon. Significación (*) p<0,05; (ns) no significativo.

e.s. error estándar de la media

G.E. Grupo Estudio

G.C. Grupo Control.

TABLA X Porcentaje de células con daño de membrana fibrilar obtenidos antes (1^o BIOPSIJA) y después (2^o BIOPSIJA) de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas, en el músculo vasto lateral.

ANIMAL	1 ^o BIOPSIJA Daño de membrana [N]	2 ^o BIOPSIJA Daño de membrana [N]
G.E. 1	0,0	33,3
2	1,2	liberado
3	0,0	liberado
4	0,0	liberado
5	1,0	20,0
6	4,9	10,0
7	0,0	20,3
8	3,0	30,8
9	0,0	liberado
10	2,7	liberado
11	1,4	11,2
media ± e.s. (p=11)	1,3 ± 0,7	
media ± e.s. (p=6)	1,7 ± 0,7	25,0 ± 4*
G.C. 12	2,0	1,0
13	0,0	1,3
14	1,7	2,5
media ± e.s. (p=3)	1,2 ± 0,6	2,0 ± 0,3 ^{ns}

Daño de membrana celular está calculado como el porcentaje de fibras con liberación de Hb y plasmidexa indicados por la fuerza de membrana expresada en 100 fibras.

Puntaje Wilcoxon. Significación (*p<0,05) y (ns) no significativo.

e.s. error estándar de la media.

G.E. Grupo Entrenado

G.C. Grupo Control.

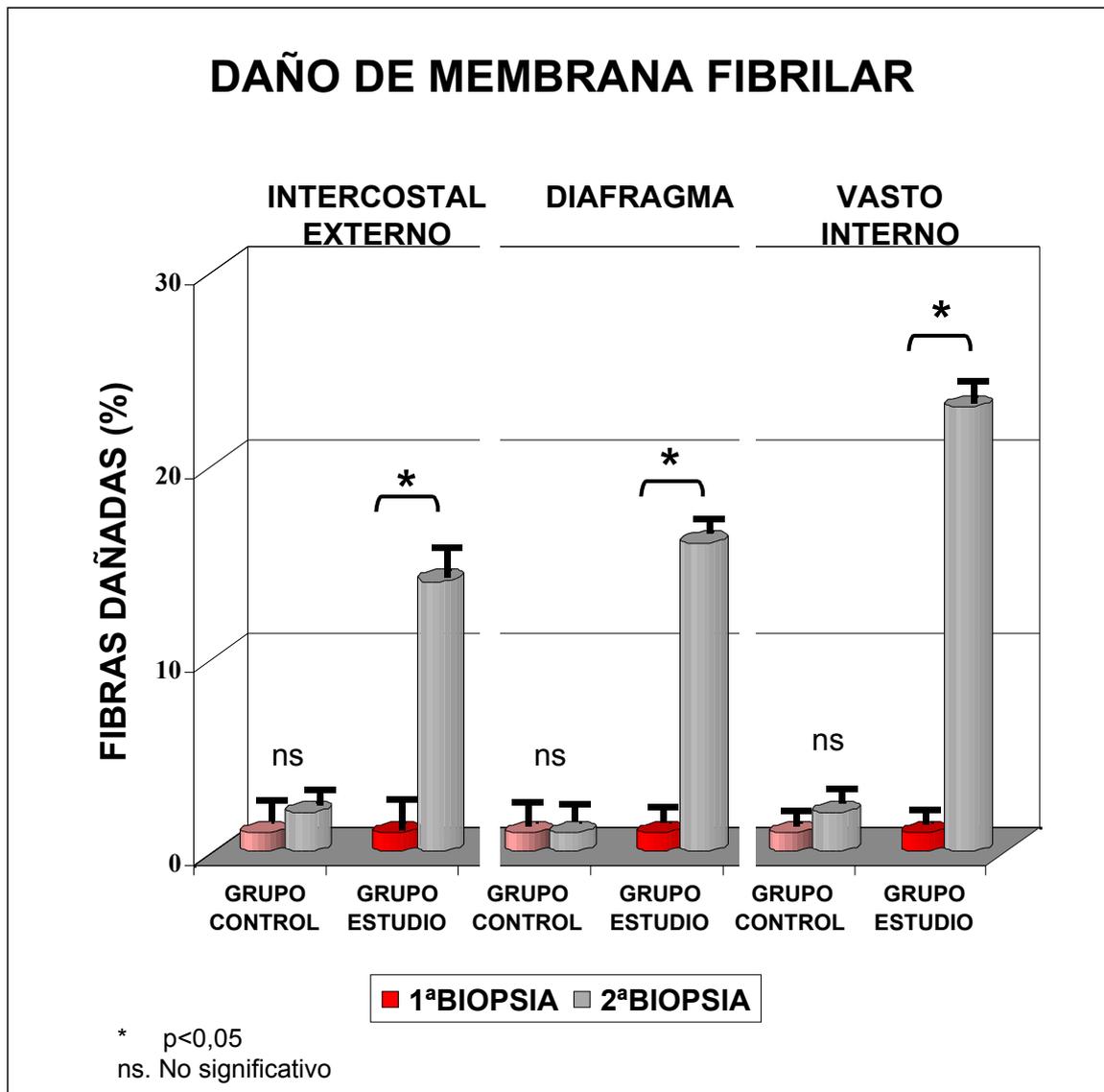


Figura 20 Histograma. Valores de fibras con daño de membrana, obtenidos antes y después de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas en los músculos estudiados.

como lo describen los autores en un modelo canino. Los controles positivos utilizados en esta técnica proceden de RNA que se obtuvieron de la estimulación, con lipopolisacárido, a un cultivo de células mononucleares de sangre periférica de perros, de la misma raza (*Beagle*), que los utilizados en el estudio (figura 13. pág. 67) como se explica en el apartado de Materiales y Métodos.

La técnica de RT-PCR solamente se realizó a los animales que tuvieron una 1ª y 2ª BIOPSIA.

Los datos obtenidos de la amplificación de TNF- α y IL-10 en todos los animales analizados se muestran en las tablas XI, XII y XIII, y en las figuras 21a) y b). En las mismas tablas se expresan los resultados medios obtenidos en la amplificación de ambas citocinas antes y después de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas en los tres músculos estudiados para los dos grupos experimentales.

Los valores medios obtenidos para la IL-10 no mostraron cambios significativos en los animales del grupo control antes y después de las cargas. Sin embargo, se puede apreciar un aumento significativo de esta citocina IL-10 como consecuencia de la aplicación de las cargas en el músculo intercostal externo (3,14u.a. \pm 0,1 vs 5,8u.a. \pm 1,6) y en el músculo diafragma (0,52u.a. \pm 0,27 vs 2,15u.a. \pm 1,44); y una tendencia no significativa ($p=0,06$) a aumentar en el músculo vasto interno en los animales del grupo estudio.

Por el contrario, la expresión del TNF- α no mostró cambios significativos en los valores medios encontrados en el grupo estudio. Sin embargo, en los animales incluidos en el grupo control se llegó a triplicar el valor inicial en la 2ª BIOPSIA. Las diferencias encontradas en los valores de TNF- α en el grupo control son elevadas en todos los músculos: intercostal externo, diafragma y vasto interno (0,07u.a. \pm 0,01 vs 0,4 u.a. \pm 0,05; 0,014u.a. \pm 0,2 vs 0,63 u.a. \pm 0,11 y 0,14u.a. \pm 0,02 vs 0,46 u.a. \pm 0,02 respectivamente) como se puede observar en las tablas XI, XII y XIII.

5,3- RESUMEN DE LOS CAMBIOS MUSCULARES INDUCIDOS POR LA APLICACIÓN DE CARGAS INSPIRATORIAS RESISTIVAS

5,3,1- Daño de membrana.

En todos los músculos estudiados en ambos grupos podemos detectar en condiciones basales un porcentaje mínimo de daño de membrana (que no supera el 2% de fibras dañadas).

TABLA XI Valores de TNF- α y IL-10 obtenidos antes (1^a BIOPSA) y después (2^a BIOPSA) de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas, en el imbriculado intracostal estirado.

ANIMAL	1 ^a BIOPSA		2 ^a BIOPSA	
	TNF- α (u.a.)	IL-10 (u.a.)	TNF- α (u.a.)	IL-10 (u.a.)
G.E. 1	0,17	53	0,03	6,1
2	nd	nd	-----	-----
3	nd	nd	-----	-----
4	nd	nd	-----	-----
5	0,0	57	0,0	2,0
6	0,0	0,98	0,05	1,7
7	0,00	0,66	0,008	1,7
8	0,0	43	0,0	7,5
9	nd	nd	-----	-----
10	nd	nd	-----	-----
11	0,0	21	0,0	6,0
media \pm e.s. (n=6)	0,04 \pm 0,3	3,14 \pm 0,1	0,015 \pm 0,06^{ns}	5,8 \pm 1,6^{ns}
G.C. 12	0,08	25	0,4	4,3
13	0,05	21	0,3	3,4
14	0,1	10	0,5	0,2
media \pm e.s. (n=3)	0,07 \pm 0,01	1,88 \pm 0,41	0,4 \pm 0,06^{ns}	2,63 \pm 1,2^{ns}

Los valores de TNF- α y IL-10 expresados en pg/ml se expresan como el valor obtenido tras la aplicación de las cargas inspiratorias resistivas en cada animal, obtenidos de la aplicación de la técnica en cada uno de los momentos estudiados (u.a.) Unidades arbitrarias de PMA, nd, valor no determinado. Puntaje Wilcoxon. Significación (*) p<0,05, (†) p<0,05; (ns) no significación. e.s. error estándar de la media. G.E. Grupo Estirado. G.C. Grupo Control.

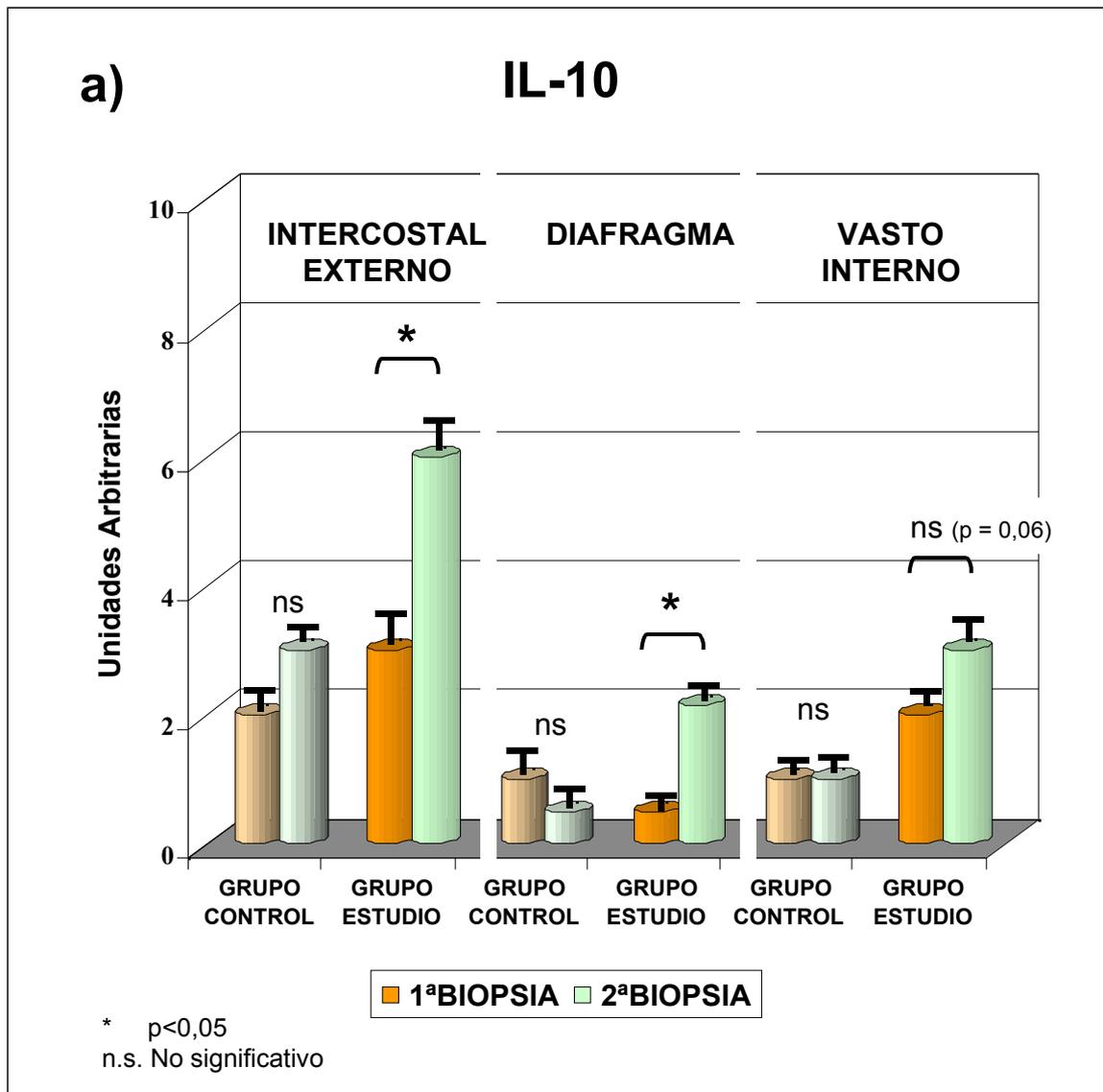


Figura 21. a) Histograma. Valores de IL-10, obtenidos antes y después de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas en los músculos estudiados.

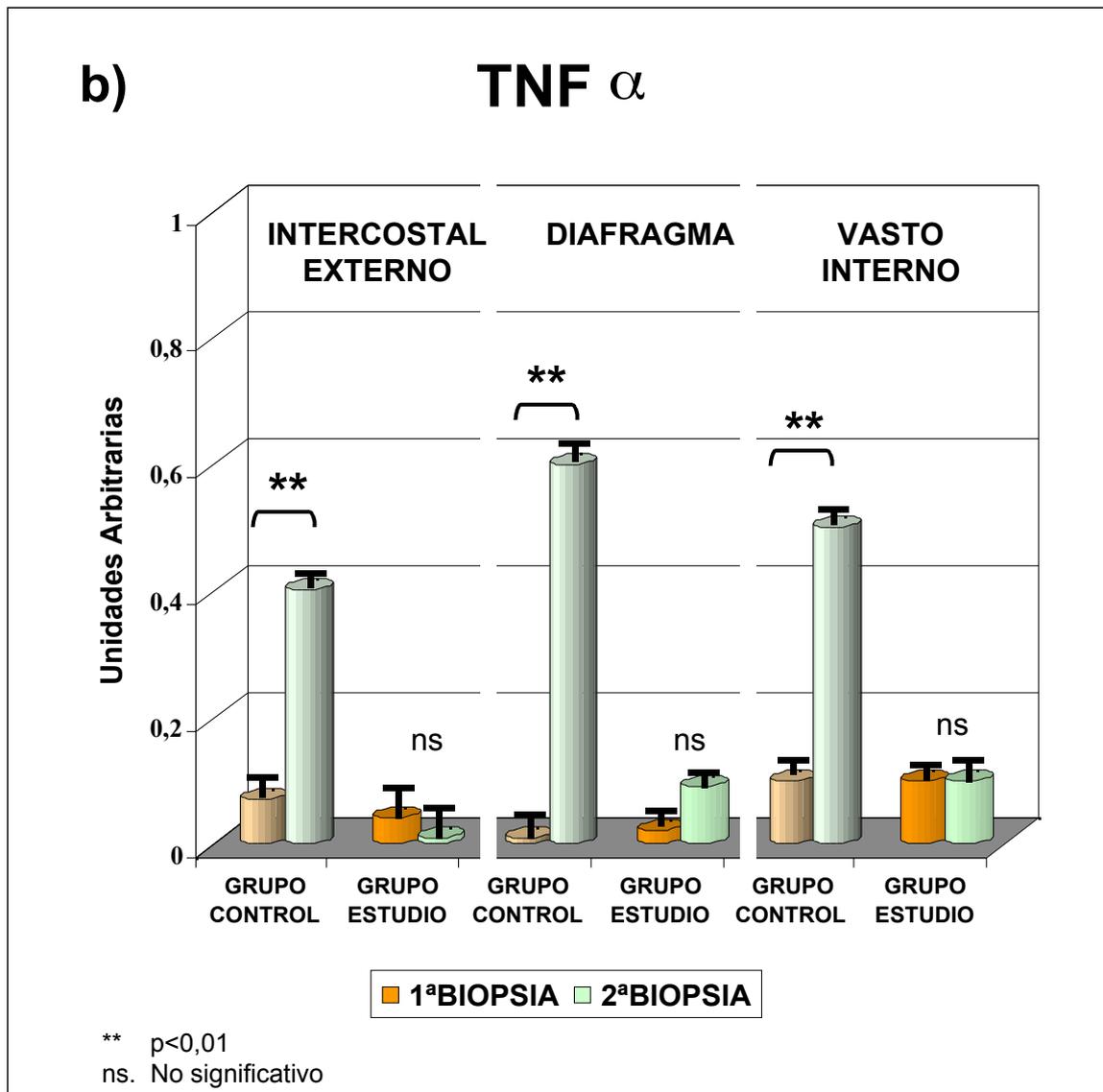


Figura 21. b) Histograma. Valores de TNF α , obtenidos antes y después de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas en los músculos estudiados.

La magnitud y la duración de las cargas utilizadas en este estudio (15% de la PIM, 2h/día durante 12 días) se pueden calificar de leves a moderadas. Sin embargo, estas cargas son suficientes para producir daño en la permeabilidad de membrana en los músculos respiratorios. La magnitud del daño fue similar en ambos músculos respiratorios. Los músculos respiratorios diafragma e intercostal externo presentaron porcentajes de daño similares después de la aplicación de las cargas inspiratorias resistivas: $16\% \pm 3,23$ y $13,9\% \pm 2$ respectivamente. Esto evidencia que las cargas experimentales inducidas en los animales actuaron con igual intensidad en ambos músculos inspiratorios.

También se objetivó un aumento del daño de membrana en otros músculos esqueléticos del animal. Estos valores de daño se observaron por igual en todos los perros procedentes del grupo estudio y no solo en alguno de ellos como se puede observar en la tabla X.

5,3,2- Estructura fibrilar.

La aplicación de las cargas inspiratorias resistivas indujeron un aumento significativo tanto en la proporción de fibras II como en las fibras híbridas en los músculos intercostal externo y vasto interno (tabla II y IV). Si hacemos el análisis de las fibras “puras” I y II, más que un aumento en el porcentaje de fibras tipo II hay una disminución de fibras tipo I puras mientras que las fibras II “puras” no presentan cambios a este nivel de cargas. Dicho de otra manera, existe un porcentaje de fibras que en el momento de la 1ª BIOPSIA estaban compuestas en su totalidad por MyHC I y a consecuencia de las cargas comienzan a expresar conjuntamente la MyHC II. En el diafragma no se expresan cambios en los porcentajes de fibras musculares.

5,3,3- Expresión de isoformas de MyHC en las fibras musculares.

La técnica de SDS-PAGE, nos brinda información estructural del contenido de isoformas de MyHC respecto al porcentaje total de miosina presente en cada muestra de homogeneizado. En ninguno de los músculos analizados por esta técnica encontramos cambios significativos en las variaciones de las proporciones medias de ambas isoformas de MyHC después de aplicarse las cargas inspiratorias resistivas.

Como consecuencia de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas hemos encontrado una disminución significativa de los valores de MyHC I en el músculo intercostal externo. En el músculo diafragma no se observan diferencias significativas para ninguna de la isoformas estudiadas antes y después de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas. Sin embargo

en el músculo vasto interno se produce una disminución significativa de la cantidad de ambas isoformas de MyHC.

5,3,4- Expresión de TNF- α e IL-10.

Como consecuencia de la aplicación de cargas inspiratorias resistivas en el grupo estudio, se puede observar un aumento significativo de los valores de IL-10 en los músculos respiratorios (intercostal externo y diafragma). Aquí cabe destacar que aunque el aumento no es significativo en el músculo vasto interno también muestra una fuerte tendencia al incremento.

La expresión de TNF- en los músculos estudiados en el grupo estudio no muestra cambios significativos entre los valores obtenidos en la 1ª y 2ª biopsia. Sin embargo, cuando analizamos los valores obtenidos en el grupo control (en este grupo solamente se le realizó la traqueostomía, pero recordemos que no recibió cargas) vemos que en todos los músculos estudiados muestra un aumento significativo de los valores de TNF- .