

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

FACULTAD DE MEDICINA

Tesis Doctoral

**CAPACIDAD OXIDATIVA DE LOS MÚSCULOS
RESPIRATORIOS Y PERIFÉRICOS EN LA EPOC**

Tesis para acceder al grado de Doctor en Medicina por la Universidad
Autónoma de Barcelona

M^a Luisa Blanco López

Director: Joaquim Gea Guiral

Tutor: Joan M^a Broquetas Doñate

Barcelona 2003

CAPACIDAD OXIDATIVA DE LOS MÚSCULOS RESPIRATORIOS Y PERIFÉRICOS EN LA EPOC

*Cualesquiera que hayan sido
nuestros logros,
alguien nos ayudó siempre
a alcanzarlos*

Althea Gibson

A mi familia y a mis amigos
por su cariño y apoyo

AGRADECIMIENTOS

Cuando uno cree haber finalizado el trabajo de tantos meses, no puede olvidar que siempre le queda algo más por hacer. Para mí resulta ser la parte más gratificante, en la que puedo expresar aquello que muchas veces por parecer obvio no se dice y que quizás habría que tratar de decir más a menudo: GRACIAS.

Al volver la vista atrás recuerdo momentos buenos y otros que no lo fueron tanto, pero en todos ellos siempre tuve a alguien a mi lado con quien compartirlos.

...Y a todos ellos van dedicadas estas palabras.

Gracias a Quim por su constancia y paciencia

Al Dr Broquetas por su confianza

A Víctor, Carles y Miquel por sus enseñanzas

A Meritxell por ser mi modelo a seguir

A Roser por escucharme

A Nuria y Angela por su apoyo

A Gloria por su cariño

A Juana M^a por su fuerza

A M^a José por sus abrazos

A Vicky por todo lo compartido

A Santi por estar a mi lado siempre

A Idoia y a Belén por su amistad

A Antonia por mostrarme su modo de ver la vida

A Pepe por ayudarme a mantener el ánimo firme

A Teresa Baró por su simpatía y su ayuda en la parte técnica

Y al resto de mis compañeros del Hospital del Mar (tanto médicos como enfermeras) por hacerme sentir “como en casa”

De corazón

MUCHAS GRACIAS

ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
APES	3 aminopropiltriétoxilano
ATP	Adenosina trifosfato
BMI	Índice de masa corporal
BSA	Albúmina de suero bovino
CMT	Carga máxima tolerada en el test de Martyn
COX	Ciclooxigenasa
CPK	Creatin fosfoquinasa
CS	Citrato sintasa
DAB	3-3 diaminobencina
DLco	Capacidad de transferencia del monóxido de carbono
EDTA	Etilendiaminotetracético
FAD ⁺ /FADH ₂	Flavina adenina dinucleótido/flavina adenina dinucleótido reducido
FGF	Factor de crecimiento de los fibroblastos
FRC	Capacidad residual funcional
G6PDH	Glucosa 6-P deshidrogenasa
HADH	3-hidroxi-acetilCoa-deshidrogenasa
HK	Hexoquinasa
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor</i>
IMP	Inosina monofosfato
LDH	Lactato deshidrogenasa
MyHC/MyLC	Cadenas pesadas de miosina/ Cadenas ligeras de miosina
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido/nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADH-TR	Nicotinamida adenosina dinucleótido tetrazolio-reductasa
OCT	Ornitin-Carbamil-transferasa
PBS	Solución <i>buffer</i> fosfato salino
PE,máx	Presión espiratoria máxima
PFK	Fosfofructoquinasa
PI,di	Presión transdiafragmática
PI,es	Presión esofágica
PI,gas	Presión gástrica
PI,máx	Presión inspiratoria máxima
PMT	Presión máxima tolerada en la prueba incremental
RQ	Cociente respiratorio (VO ₂ /VCO ₂)
RR	Frecuencia respiratoria
RV	Volumen residual
SDH	Succinato deshidrogenasa
SGaw	Conductancia específica
TGF-β ₁	<i>Transforming growth factor</i>
T _I	Tiempo inspiratorio
TLC	Capacidad pulmonar total
Tlím	Tiempo de resistencia
TNF-α	Factor de necrosis tumoral
TTI/ TT _{MR}	Índice tensión tiempo/ Índice tensión tiempo de los músculos respiratorios
T _{TOT}	Tiempo respiratorio total
VCO ₂	Producción de anhídrido carbónico
V _E	Volumen minuto
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VO ₂	Consumo máximo de oxígeno
Vt	Volumen corriente
WR	Carga máxima tolerada en la cicloergometría

NOTA PRELIMINAR

Los resultados de esta tesis han sido presentados en diferentes congresos:

- Capacitat oxidativa del diafragma costal en pacients amb MPOC. ML Blanco, M Pastó, J Gea, O Cabezas, J Palomeque, J Broquetas. XVII Diada Pneumològica. 9-10 abril 1999. Mataró. *Annals de Medicina 1999; 82 (suppl):18s.*
- Bioenergètica cel.lular en el múscul deltoides dels malalts amb MPOC. ML Blanco, J Gea, M Pastó, MA Carmona, M Félez, J Broquetas. XVII Diada Pneumològica. 9-10 abril 1999. Mataró. *Annals de Medicina 1999; 82 (suppl): 18s.*
- Capacidad oxidativa en el deltoides en pacientes con EPOC. ML Blanco, J Gea, M Pastó, MA Carmona, M Félez, J Broquetas. XXXII Congreso Nacional SEPAR. 15-18 Mayo 1999. Barcelona. *Arch Bronconeumol 1999; 35 (suppl): 7.*
- Oxidative and glycolitic activities in respiratory and upper limb skeletal muscles of severe CPOD patients. ML Blanco, MA Carmona, M Pastó, M Orozco-Levi, M Félez, J Palomeque, J Gea. Congreso Anual de la European Respiratory Society (ERS). 9-13 octubre 1999. Madrid. *Eur Respir J 1999; 14 (suppl): 427s.*
- Capacidad aeróbica de los músculos respiratorios de pacientes con EPOC: cuatro aproximaciones diagnósticas. ML Blanco, J Gea, M Pastó, J Palacio, JM Corominas, M Orozco-Levi, JM Broquetas. VIII symposium sobre enfermedad pulmonar obstructiva crónica. 14-16 Marzo 2002. Barcelona. Publicado en el Libro de resúmenes del congreso.
- Potencial aeròbic en els diafragma i l'intercostal extern de pacientes amb MPOC. ML Blanco, J Gea, M Pastó, N Hernández, JM Corominas, M Orozco-Levi, JM Broquetas. XX Diada Pneumològica. 12-13 abril 2002. Sant Boi de Llobregat.

- Heterogeneity of diaphragmatic remodelling in COPD patients: Changes in different structural and metabolic components involved in the aerobic capacity of the muscle. ML Blanco, J Gea, M Pastó, M Orozco-Levi, J Minguella, J Broquetas. Congreso Anual de la European Respiratory Society (ERS). 14-18 Septiembre 2002. Estocolmo. Suecia. *Eur Respir J* 2002; 20 (38): 496s.

- Phenotypic heterogeneity in the structural and metabolic factors contributing to oxidative capacity in respiratory muscles of COPD patients. ML Blanco, M Pastó, J Palacio, M Orozco-Levi, J Broquetas, J Gea. Aceptado para su presentación como póster en el congreso anual de la American Thoracic Society (ATS). 16-21 Mayo 2003.

- La actividad enzimática en el ciclo de Krebs aparece como factor limitante en la adaptación aeróbica del diafragma en pacientes con EPOC. L Blanco, M Pastó, Palacio J, Santos MJ, Orozco-Levi M, Broquetas J, Gea J. Aceptado para su presentación como póster en el XXXVI Congreso Nacional SEPAR. Zaragoza 7-10 junio 2003.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	7
2	ANATOMÍA DE LOS MÚSCULOS RESPIRATORIOS.....	8
2.1	Músculos inspiratorios	8
2.1.1	Diafragma	8
2.1.2	Intercostales externos.....	9
2.1.3	Intercostales paraesternales	9
2.2	Músculos espiratorios	9
2.2.1	Músculo recto del abdomen	9
2.2.2	Músculo oblicuo mayor.....	9
2.2.3	Músculo oblicuo menor.....	9
2.2.4	Músculo transverso del abdomen	10
3	ESTRUCTURA TISULAR, CELULAR Y MOLECULAR DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO	10
3.1	TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES	11
3.1.1	TIPOS CELULARES EN LOS MÚSCULOS RESPIRATORIOS Y DE LAS EXTREMIDADES.....	14
3.2	ULTRAESTRUCTURA DE LA FIBRA MUSCULAR ESQUELÉTICA.....	15
3.3	ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA FIBRA MUSCULAR ESQUELÉTICA	19
3.3.1	Miosina	19
3.3.2	Actina.....	23
3.3.3	Tropomiosina	24
3.3.4	Troponina	25
3.3.5	Otras moléculas de interés	26
4	FUNCIÓN DE LOS MÚSCULOS RESPIRATORIOS Y <i>PERIFÉRICOS</i> ...	28
4.1	PROPIEDADES FUNCIONALES DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO	28
4.1.1	Propiedades funcionales de los músculos respiratorios	28
4.2	EVALUACIÓN FUNCIONAL	32
4.2.1	Evaluación de la fuerza muscular respiratoria	32
4.2.2	Evaluación de la resistencia muscular respiratoria.....	36
4.2.3	Evaluación de la fatiga muscular respiratoria	37
5	FENÓMENOS ADAPTATIVOS EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO	41
5.1	ADAPTACIÓN DE LOS MÚSCULOS RESPIRATORIOS EN LA ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC)	42
5.1.1	Hiperinsuflación	42
5.1.2	Aumento del trabajo respiratorio	43
5.1.3	Alteración del estado nutricional.....	43
5.1.4	Inflamación y estrés oxidativo.....	44
5.2	ADAPTACIÓN DE LOS MÚSCULOS PERIFÉRICOS EN LA EPOC	45
6	METABOLISMO Y ENERGÍA.....	47

6.1	El ATP como fuente de energía	47
6.2	Otras fuentes de energía en el músculo esquelético	48
6.3	GLICÓLISIS (Figura 17)	49
6.4	CICLO DEL ÁCIDO CÍTRICO (Figura 19)	53
6.5	FOSFORILACIÓN OXIDATIVA	57
6.6	RENDIMIENTO DE ATP EN LA OXIDACIÓN TOTAL DE LA GLUCOSA	59
6.7	CAPACIDAD OXIDATIVA DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO	60
6.7.1	Determinación del tipo de fibra muscular	60
6.7.2	Determinación de la capacidad enzimática	64
6.7.3	Densidad capilar	67
6.8	CAMBIOS INDUCIDOS POR EL ENTRENAMIENTO EN LOS MÚSCULOS ESQUELÉTICOS	71
7	HIPÓTESIS	74
8	OBJETIVOS	77
8.1	OBJETIVO GENERAL	77
8.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	77
9	MATERIAL Y MÉTODOS	79
9.1	DISEÑO DEL ESTUDIO	79
9.2	POBLACIÓN	79
9.2.1	CRITERIOS DE INCLUSIÓN	79
9.2.2	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	80
9.3	TÉCNICAS	81
9.3.1	Evaluación clínica y del estado nutricional	81
9.3.2	Evaluación de la función muscular global	81
9.3.3	Evaluación de la función respiratoria	81
9.3.4	Evaluación de los músculos respiratorios	82
9.3.5	Obtención de las muestras	85
9.3.6	Procesamiento de las muestras	88
10	RESULTADOS	99
10.1	DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA EN SU TOTALIDAD	99
10.1.1	Características clínicas y nutricionales	99
10.1.2	Función pulmonar	99
10.1.3	Función muscular, periférica y respiratoria	99
10.1.4	Patrón ventilatorio basal	100
10.1.5	Prueba ergométrica incremental	100
10.1.6	Análisis estructural de los músculos respiratorios y periféricos	101

10.1.7	Actividad enzimática.....	101
10.1.8	Densidad capilar	102
10.2	COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS.....	104
10.2.1	Características clínicas.....	104
10.2.2	Función pulmonar	104
10.2.3	Fuerza, resistencia y reserva de los músculos respiratorios	104
10.2.4	Fuerza de los músculos periféricos.....	105
10.2.5	Patrón ventilatorio	105
10.2.6	Prueba ergométrica.....	105
10.2.7	Variables morfométricas	105
10.2.8	Actividad enzimática fibrilar (Tablas 12, 13 y 14; gráficos 1 y 2).....	106
10.2.9	Actividad enzimática muscular global (Tablas 12, 13 y 14; gráfico 4A y 4B).....	106
10.2.10	Densidad capilar (Tablas 15, 16 y 17; gráfico 5).....	107
10.2.11	Comparación de los dos métodos de determinación de fibras oxidativas.....	108
10.2.12	Comparación de la capacidad oxidativa entre los tres músculos analizados	108
10.3	CORRELACIONES	111
10.3. A.	MUSCULOS RESPIRATORIOS.....	111
A.1.	DIAFRAGMA.....	111
10.3.1	Estructura muscular con función pulmonar.....	111
10.3.2	Actividad enzimática con función pulmonar	111
10.3.3	Densidad capilar con función pulmonar.....	112
10.3.4	Estructura muscular con función muscular y capacidad de ejercicio	113
10.3.5	Función muscular y capacidad de ejercicio con actividad enzimática	113
10.3.6	Densidad capilar con función muscular y capacidad de ejercicio	114
10.3.7	Estrucutura muscular con metabolismo.....	114
A.2.	INTERCOSTAL.....	116
10.3.1	Estructura muscular con función pulmonar	116
10.3.2	Actividad enzimática con función pulmonar	116
10.3.3	Densidad capilar con función pulmonar	117
10.3.4	Estructura muscular con función muscular y capacidad de ejercicio	117
10.3.5	Función muscular y capacidad de ejercicio con actividad enzimática	117
10.3.6	Densidad capilar con función muscular y capacidad de ejercicio	118
10.3.7	Estrucutura muscular con metabolismo	118
10.3. B.	MUSCULOS PERIFÉRICOS.....	120
B.1	DELTOIDES.....	120
10.3.1	Estructura muscular con función pulmonar	120
10.3.2	Actividad enzimática con función pulmonar.....	120
10.3.3	Densidad capilar con función pulmonar	121
10.3.4	Estructura muscular con función muscular y capacidad de ejercicio	121
10.3.5	Función muscular y capacidad de ejercicio con actividad enzimática	121
10.3.6	Densidad capilar con función muscular y capacidad de ejercicio.....	121
10.3.7	Estrucutura muscular con metabolismo	122
11	DISCUSIÓN	124
11.1	MÚSCULOS RESPIRATORIOS	126
11.1.1	DIAFRAGMA	126
11.1.2	MÚSCULO INTERCOSTAL EXTERNO	130
11.2	MÚSCULOS PERIFÉRICOS.....	134
11.2.1	MÚSCULO DELTOIDES	134

11.3	CAPACIDAD OXIDATIVA EN LOS TRES MÚSCULOS ANALIZADOS.....	137
11.4	COMPARACIÓN DE LOS DOS MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN DE FIBRAS OXIDATIVAS	138
12	CONCLUSIONES	140
13	BIBLIOGRAFIA.....	143

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

El **pulmón** es el órgano encargado de realizar el intercambio gaseoso, obteniendo oxígeno del aire y eliminando anhídrido carbónico. Este proceso se denomina **respiración** y depende de la acción de diversos grupos musculares (**músculos respiratorios**).

La **inspiración** es un proceso activo, que requiere que se produzca un gradiente de presiones. Antes de iniciarse la inspiración, la presión intrapleural es ligeramente negativa a causa de la retracción elástica pulmonar. La presión alveolar, en cambio, es de cero y no existe flujo aéreo. Cuando la presión pleural se hace más negativa, al contraerse los músculos inspiratorios, esta negatividad se transmite a la presión alveolar, por lo que se establece un gradiente de presión con la atmósfera que favorece el flujo aéreo (West 1987¹; Schmidt 1993²).

La **espiración** se produce de manera pasiva durante la respiración en reposo, debido a las propiedades elásticas del pulmón y de la pared torácica. Sin embargo, se convierte en un proceso activo durante el ejercicio y en sujetos con cargas ventilatorias aumentadas (p.e. en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o EPOC).

Durante la espiración disminuye la negatividad de la presión pleural, llegando a ser positiva la presión alveolar y produciéndose la salida de aire. En la espiración forzada, la presión intrapleural asciende por encima de cero como consecuencia de la contracción de los músculos espiratorios y la alveolar es aún más positiva lo que favorece aún más la exhalación (West 1987¹; Schimdt 1993²).

El músculo inspiratorio más importante, en reposo y en sujetos sanos, es el **diafragma**. Al contraerse, el contenido abdominal se desplaza hacia abajo y adelante, aumentando el diámetro vertical de la caja torácica. Al mismo tiempo, los bordes de las costillas se levantan y se desplazan hacia fuera, haciendo que también aumente el diámetro transversal.

Los **músculos intercostales externos** e **intercostales paraesternales** a su vez, traccionan las costillas hacia arriba y adelante, incrementando los diámetros lateral y anteroposterior del tórax. Contribuyen al esfuerzo inspiratorio de forma progresiva, sobre todo a medida que aumentan las cargas.

Los **músculos accesorios de la inspiración** comprenden entre otros los escalenos, que elevan las dos primeras costillas, los esternocleidomastoideos que elevan el esternón e incluso, el dorsal ancho (Orozco 1995³).

Los **músculos espiratorios** más importantes son los de la pared abdominal (**recto del abdomen, oblicuos mayor y menor y tranverso**), que al contraerse producen un aumento de la presión abdominal y empujan el diafragma hacia arriba.

También los **músculos intercostales internos** participan en la espiración activa, traccionando las costillas hacia abajo y adentro, y reduciendo así el volumen torácico.

2 ANATOMÍA DE LOS MÚSCULOS RESPIRATORIOS

2.1 Músculos inspiratorios

2.1.1 Diafragma

Las fibras musculares del diafragma se originan en la cara anterior de la columna lumbar y contorno inferior de la caja torácica.

A nivel vertebral el diafragma se inserta en las tres primeras vértebras lumbares (**diafragma crural**), donde los fascículos musculares se organizan en cordones que se denominan pilares. Dos de ellos se implantan en la cara anterior de los cuerpos vertebrales (pilares anteriores o principales) y otros dos en las caras laterales (pilares laterales o secundarios). A nivel torácico se fijan, por delante, en la base del apéndice xifoides (**diafragma costal**); y por detrás, desde la séptima a la duodécima costilla (Sobota 1974⁴; Testut 1979⁵).

La inervación del diafragma procede de los nervios frénicos, que se originan en la médula cervical, y por algunas ramas procedentes de los últimos nervios intercostales. El diafragma está vascularizado por ramas de la arteria mamaria interna, ramas de la arteria mediastínica posterior y de la diafragmática inferior, lo que asegura un correcto aporte de oxígeno al músculo, aún en situaciones extremas.

2.1.2 Intercostales externos

Los músculos intercostales externos se extienden desde la articulación transversocostal hasta la condrocostal y constituyen el plano más superficial del espacio intercostal. Su irrigación procede de la arteria intercostal o sus ramas. Están inervados por el nervio intercostal.

2.1.3 Intercostales paraesternales

Los intercostales paraesternales representan la porción condroesternal de los intercostales internos y se extienden desde el esternón hasta el ángulo posterior de las costillas. Están inervados por ramas del nervio intercostal y su vascularización procede de ramas de la arteria intercostal.

2.2 Músculos espiratorios

Los principales músculos espiratorios son, como se ha mencionado anteriormente, los de la pared abdominal: recto del abdomen, oblicuos mayor y menor y transversos.

2.2.1 Músculo recto del abdomen

El recto del abdomen se inserta, en su porción inferior, en el pubis. Al llegar al tórax se divide en tres lengüetas que se insertan en el borde inferior del cartílago de la quinta, sexta y séptima costillas, ligamento costoxifoideo y apéndice xifoides. Está irrigado por ramas de las arterias epigástrica y mamaria interna e inervado por los seis últimos nervios intercostales y ramas del plexo lumbar (nervio abdominogenital mayor).

2.2.2 Músculo oblicuo mayor

El oblicuo mayor es el músculo más superficial del abdomen lateral. Se inserta, por arriba, en el borde inferior de la séptima y octava costillas, y por abajo en la cresta ilíaca, hueso coxal y línea blanca.

Está vascularizado por ramas de las arterias intercostales, lumbares, circunfleja e ilíaca profunda. Su inervación procede de los nervios intercostales inferiores y ramas del plexo lumbar (nervios abdominogenitales mayor y menor).

2.2.3 Músculo oblicuo menor

El oblicuo menor se sitúa por debajo del anterior. Tiene sus inserciones, por arriba, en los últimos cartílagos costales y por abajo, en la espina ilíaca anterosuperior y cresta ilíaca. Su

vascularización procede de ramas de las arterias epigástrica y mamaria interna. Está inervado por los nervios intercostales inferiores y por las dos ramas abdominogenitales del plexo lumbar.

2.2.4 Músculo transverso del abdomen

El músculo transverso del abdomen se inserta en la porción cartilaginosa de las seis últimas costillas, cresta ilíaca y apófisis transversas de la columna lumbar. Posee una vascularización escasa que procede de ramas de las arterias mamaria interna, epigástrica y circunfleja. Su inervación es la misma que la del oblicuo menor (Testut 1979⁵).

3 ESTRUCTURA TISULAR, CELULAR Y MOLECULAR DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO

El tejido muscular es un tejido que tiene la propiedad de contraerse, es decir, disminuir su longitud en respuesta a un estímulo. El mecanismo de contracción está basado en la disposición de forma organizada de proteínas fibrilares en el citoplasma y enlazadas por puentes intermoleculares. La contracción se produce por la reorganización de los puentes intermoleculares con la utilización de energía química.

Existen tres tipos de tejido muscular:

- **Músculo esquelético.** Es el responsable del movimiento y de la respiración. Se denomina a menudo *músculo voluntario*, porque puede tener un control voluntario o consciente. La disposición de las proteínas estructurales determina la aparición de estriaciones transversales de ahí el nombre de *músculo estriado*.
- **Músculo liso.** Constituye el componente contráctil de estructuras como los vasos sanguíneos, tubo digestivo, útero y vejiga urinaria. Está sometido a control autónomo y hormonal, por lo que se considera como *músculo involuntario*. La disposición de las proteínas no da lugar en este caso a la presencia de estriaciones, por lo que se le da el nombre de "liso".
- **Músculo cardíaco.** Tienen características intermedias entre los dos anteriores y es el responsable de la contracción rítmica y continua del corazón. Su aspecto también es estriado, aunque se puede distinguir fácilmente del músculo esquelético.

El MÚSCULO ESQUELÉTICO está compuesto por unidades contráctiles denominadas **fibras musculares**, unidas unas a otras por tejido colágeno. Su tamaño es variable, con un diámetro que puede oscilar entre 10 a 100 μm y una extensión de hasta 35 cm. Su **membrana plasmática o sarcolema** está constituida por una estructura interna denominada **plasmalema** y una membrana externa o **basal**, ambas íntimamente unidas. Cada fibra muscular está constituida por **miofibrillas**, estructuras alargadas y cilíndricas que se disponen de forma paralela unas a otras en el sarcoplasma (Burkitt 1993⁶).

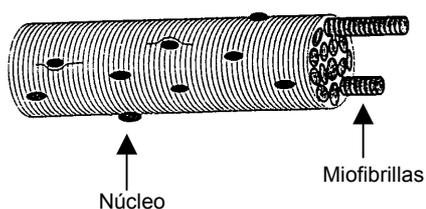


Figura 1. Estructura de la fibra muscular esquelética

La contracción está controlada por fibras nerviosas, que se ramifican en el interior del músculo para inervar a un grupo de fibras musculares, descritas como **unidad motora**. La excitación de un nervio motor origina una contracción simultánea de todas las fibras musculares correspondiente a la unidad motora.

Las células musculares individuales (**fibras** musculares) se agrupan en haces alargados llamados **fascículos**, con un tejido de soporte denominado **endomisio** que se sitúa en los espacios entre las fibras musculares. Cada fascículo está rodeado a su vez por tejido conectivo laxo denominado **perimisio**. Toda la masa muscular está incluida en una densa vaina de colágeno denominada **epimisio**, atravesado por grandes vasos y nervios que se van ramificando en el perimisio y endomisio por todo el músculo (Burkitt 1993⁶).

3.1 TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES

Clásicamente, a través de la simple **observación** macroscópica, se va a establecer la existencia de dos tipos de fibras: **rojas** y **blancas**.

Las primeras son de menor tamaño y contienen abundantes mitocondrias, así como una gran cantidad de mioglobina, una molécula de almacenamiento de oxígeno análoga a la

hemoglobina, lo que justifica el color rojo de estas fibras. Además poseen una rica vascularización.

Las segundas son de mayor tamaño en la sección transversal, contienen pocas mitocondrias y relativamente poca hemoglobina; también tienen una vascularización relativamente pobre. Sin embargo son ricas en glucógeno y enzimas glicolíticas. Son de color blanco (Ross 1997⁷).

Posteriormente con la introducción de **técnicas histoquímicas** Dubowitz pudo identificar los grados de actividad enzimática que existen en los diferentes tipos de fibras, estableciendo una primera distinción entre las **fibras tipo I, de metabolismo predominantemente oxidativo, y las tipo II o fundamentalmente glicolíticas**. Técnicas histoquímicas más complejas, como la detección de la actividad de la ATPasa, han permitido confirmar esta clasificación. Se han diferenciado las fibras en dos tipos básicos, I y II, en función de la actividad de su enzima ATPasa. Las fibras de tipo I muestran una escasa actividad, frente a las de tipo II en las que esta actividad es mayor (Engel 1962⁸). Al modificar la alcalinidad del medio de incubación, se pudo establecer una subdivisión en las fibras de tipo II: las denominadas fibras tipo IIa experimentan una reacción débil frente a la ATPasa en cualquier medio ácido (pH 4.2, pH 4.6). Por el contrario, las de tipo IIb presentan una reacción fuerte en medio moderadamente ácido (pH 4.6), que se debilita al aumentar la acidez (pH 4.3) (Brooke 1969⁹). A partir de los estudios realizados en un modelo animal (músculo de rata), actualmente se conoce un tercer tipo de fibras tipo II, el tipo IIc, que mantiene una reacción fuerte incluso en medios muy ácidos.

En base a los estudios de **función contráctil** también se han podido clasificar las fibras musculares en dos grandes grupos: **fibras de contracción rápida (*fast-twitch* o FT)** y **fibras de contracción lenta (*slow-twitch* o ST)**.

Las fibras de contracción lenta poseen un velocidad de contracción entre 50-80 m/seg y son fácilmente estimulables; mientras que las rápidas se estimulan con mayor dificultad, pero poseen velocidades de conducción superiores, entre 70-110 m/seg.

Cuando se aplica un estímulo a una fibra de contracción rápida se observan dos tipos de respuesta: unas son relativamente resistentes a la fatiga mientras que otras la desarrollan

fácilmente (Burke 1973¹⁰). En las fibras lentas, sin embargo, el estímulo repetido de baja frecuencia no provoca la aparición de fatiga.

Además existe una clasificación de las fibras atendiendo a las moléculas contráctiles que expresan predominantemente. Esta clasificación, basada en las isoformas de miosina, es complementaria de las aquí expuestas y se detalla más adelante.

Actualmente y combinando los diferentes conocimientos estructurales, metabólicos y funcionales, se considera que existen tres tipos de fibras:

- **Fibras tipo I**, de metabolismo predominantemente oxidativo o aeróbico. Se caracterizan por una oxidación lenta de la glucosa y una mayor resistencia a la fatiga. Son fibras de contracción lenta y se corresponden con las fibras rojas. Su actividad ATPasa es baja.
- **Fibras tipo IIa**. Tienen un metabolismo intermedio entre las oxidativas y las glicolíticas; presentan una glicólisis oxidativa rápida y su fatigabilidad es intermedia. Son fibras de contracción rápida y pertenecen al grupo de fibras rojas. Poseen actividad ATPasa a pH alcalino y en menor grado actividades NADH-TR (nicotinamida adenosina dinucleótido tetrazolio-reductasa) y SDH (succinato dehidrogenasa).
- **Fibras tipo IIb ó IIx**, glicolíticas o anaeróbicas. Tienen una glicólisis rápida y son sensibles a la fatiga. Son fibras de contracción rápida y potente. Anatómicamente se corresponden con las fibras blancas. Poseen actividad ATPasa a pH alcalino y moderadamente ácido; y en menor grado, actividades NADH-TR y SDH.

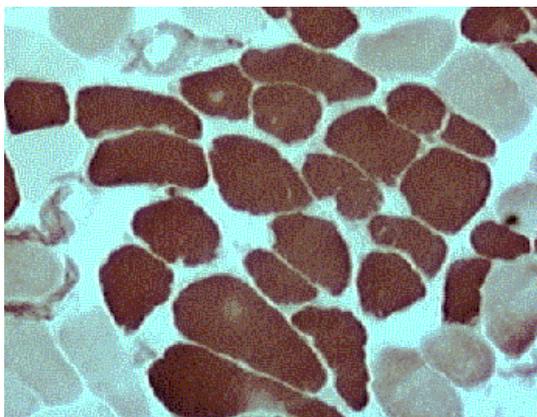


Figura 2. Sección transversal de un músculo esquelético. Técnica de ATPasa (Imagen propia).

3.1.1 TIPOS CELULARES EN LOS MÚSCULOS RESPIRATORIOS Y DE LAS EXTREMIDADES

El **diafragma de individuos sanos** contiene aproximadamente un 80% de fibras resistentes a la fatiga (55% tipo I, 25% tipo IIa) muy superior al de los músculos de las extremidades donde este porcentaje es sólo del 40% (Rochester 1985¹¹; Sauleda 1994¹²; Pastó 1998¹³). Además, el contenido mitocondrial es también mayor en el diafragma que en el mismo tipo de fibra de los músculos de las extremidades (Edwards 1986¹⁴). Otros músculos respiratorios tienen proporciones diferentes de fibras tipo I: intercostales externos(46-66%) (Aguar 1995¹⁵), escalenos (60-65%), abdominales (30-60%) (Barreiro 1999¹⁶) y dorsal ancho (44-48%) (Sauleda 1994¹²; Orozco 1995¹⁷).

El tipo de fibra determina el espectro de posibles respuestas contráctiles. Así los músculos con altas proporciones de fibras tipo I están mejor equipados para esfuerzos sostenidos de baja intensidad, mientras que aquellos con predominancia de fibras tipo II son óptimas para desarrollar trabajo de velocidad y alta potencia pero corta duración.

En los músculos respiratorios se combinan las dos propiedades, permitiendo la resistencia a la fatiga necesaria para la movilización del volumen corriente durante toda la vida, así como ejecutar actividades de alta demanda, como el ejercicio, suspirar o toser. La proporción de cada tipo de fibras en un músculo es dinámica y puede cambiar en respuesta a varios factores, como la edad, el estado nutricional proteico-calórico, el entrenamiento y la sobrecarga ventilatoria crónica (Epstein 1994¹⁸; Levine 1997¹⁹).

En los **pacientes con EPOC** considerados de forma global, el porcentaje de fibras resistentes a la fatiga en el **diafragma** parece similar al de los individuos sanos (53% tipo I, 47% tipo II). Sin embargo tanto el diámetro global como el de las fibras tipo I parece ligeramente inferior (Pastó 1998¹³). Sin embargo, el porcentaje de las fibras tipo I se correlaciona de forma directa con el grado de atrapamiento aéreo. Así pacientes con alteración ventilatoria más grave, sí muestran un aumento significativo de la proporción de fibras tipo I (Levine 1997¹⁹). A su vez, el tamaño global de las fibras se correlaciona inversamente con el grado de obstrucción. Asimismo el tamaño de las fibras tipo I se correlaciona inversamente con los volúmenes pulmonares estáticos y el de las tipo II con el grado de obstrucción (Pastó 1998¹³).

En el músculo **intercostal externo de pacientes con EPOC**, el porcentaje de fibras de tipo I es menor (entre 41 y 56% según autores); llegando a predominar las fibras de tipo II (44-60%), y entre ellas las IIa (31-43%). El tamaño fibrilar es normal (Aguar 1995¹⁵). En los **músculos periféricos** (cuádriceps) también predominan las fibras de tipo II (52-72%), y dentro de ellas las IIa (31-53%) (Aguar 1995¹⁵). Además el porcentaje de fibras de tipo II es superior al de individuos sanos con actividades físicas habituales. En el deltoides de los pacientes con EPOC, el porcentaje fibrilar es similar para las fibras tipo I y tipo II (44-56%). Este porcentaje se correlaciona de forma directa con los volúmenes pulmonares estáticos, en forma similar a lo observado en el diafragma. El tamaño fibrilar es normal y no se correlaciona con los volúmenes pulmonares aunque sí con la fuerza de las extremidades superiores (Pastó 1998¹³).

3.2 ULTRAESTRUCTURA DE LA FIBRA MUSCULAR ESQUELÉTICA

Cada miofibrilla posee estriaciones transversas que se corresponden con las bandas visibles en microscopía óptica. Las bandas denominadas **Z** son más densas y dividen a cada una de las miofibrillas en unidades contráctiles denominadas **sarcómeras**, que se repiten cada 2,3 μm a lo largo del eje de la fibrilla.

La banda oscura **A** está dividida en dos por la banda **H** (más clara), que a su vez está dividida por otra banda más densa **M** (banda medial).

Independientemente del grado de contracción de la fibra muscular la banda **A** mantiene constante su anchura, lo que significa que los filamentos gruesos no cambian de tamaño. Asimismo la distancia entre la línea **Z** y el borde adyacente de la zona **H** también es constante, lo que indica que los filamentos finos tampoco cambian de tamaño. Sin embargo, las bandas **I** y **H** se acortan durante la contracción y las bandas **Z** se aproximan unas a otras. Esto se explica por el deslizamiento de los filamentos.

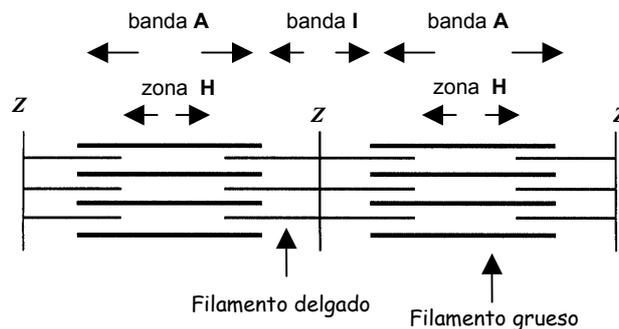


Figura 3a. Esquema de la sarcómera

La sarcómera está formada por dos tipos de miofilamentos: **filamentos gruesos** con un diámetro de unos 15 nm, están formados principalmente por moléculas de **miosina**, que se mantienen en posición gracias a sus uniones a una zona en forma de disco representada por la zona **M**; y **filamentos finos**, con un diámetro de 9 nm, compuestos principalmente por la proteína **actina**, aunque también contienen **tropomiosina** y el complejo de **troponina** y que están anclados a una zona en forma de disco representada por la línea **Z**. Las bandas **I** y **H**, ambas de baja electrodensidad, representan áreas en donde los filamentos gruesos y finos no se solapan unos con otros. Cada filamento delgado tiene como vecinos tres filamentos gruesos y cada filamento grueso está rodeado a su vez por seis filamentos delgados. Cuando la fibra muscular presenta su longitud de reposo, la longitud de la sarcómera es aproximadamente de 230 μm (McComas 1996²⁰).

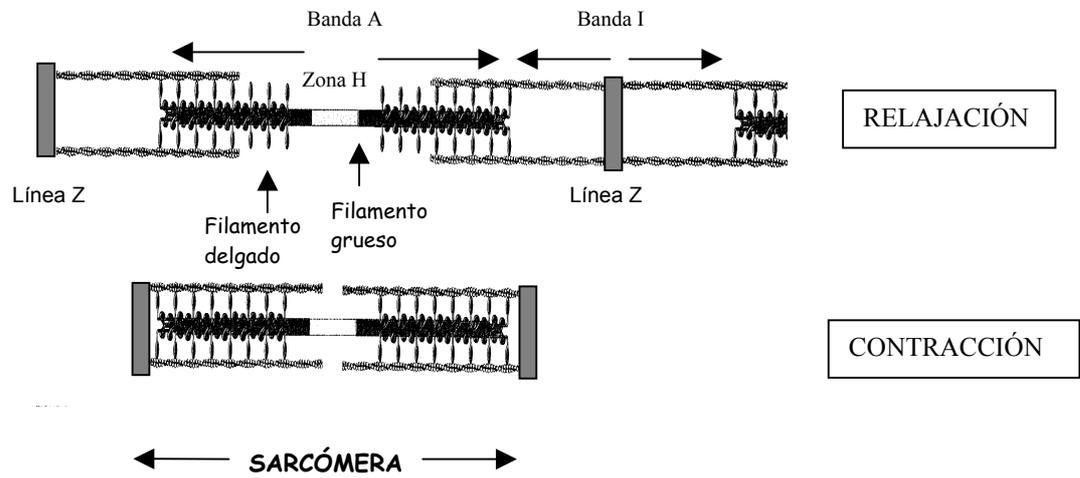


Figura 3b. Detalle de la disposición de los filamentos en la sarcómera.

La **teoría del deslizamiento** propone que mediante el uso de energía proporcionada por el ATP, los filamentos finos se deslizan sobre los gruesos, causando así el **acortamiento** de la sarcómera.

Para que se produzca la contracción sincrónica de todas las sarcómeras existe un sistema de túbulos, el **sistema T**, que penetra transversalmente en la célula muscular y rodea a cada miofibrilla en la zona de unión de las bandas **A** e **I**. Entre los túbulos hay un segundo sistema de membranas, el **retículo sarcoplásmico**, que forma una red membranosa englobando a cada miofibrilla. A ambos lados de cada túbulo T, el retículo sarcoplásmico muestra una disposición en forma de **cisternas** planas. Cada par de cisternas terminales con un túbulo T forma una **tríada**, cerca de la unión de las bandas **I** y **A** de cada sarcómera.

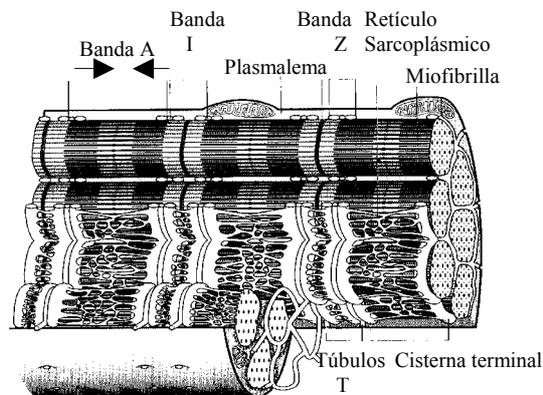


Figura 4. Esquema del sistema de conducción del estímulo contráctil (Extraído de Burkitt)

En la luz del retículo sarcoplásmico se concentran iones de calcio. La despolarización del sarcolema de la fibra muscular se extiende rápidamente por todo el sarcoplasma a través del sistema de túbulos T. Ésto estimula la liberación de iones de calcio desde el retículo sarcoplásmico hacia el sarcoplasma que rodea a los miofilamentos. Los iones de calcio activan el mecanismo de deslizamiento de los filamentos, provocando la contracción muscular (Burkitt 1993⁶).

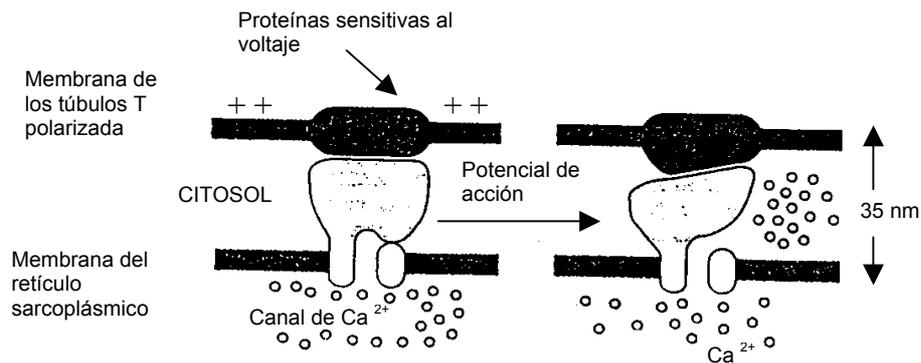


Figura 5. Despolarización de la membrana de los túbulos T, con apertura de los canales de Ca^{2+} (extraído de Alberts).

Las **mitocondrias** son los organelos energéticos de la célula, dado que tienen un alto contenido en enzimas que catalizan la oxidación de los elementos nutritivos, transformándolos en anhídrido carbónico y agua (Lehninger 1986²¹). Se disponen de forma longitudinal entre las miofibrillas. Las mitocondrias están constituidas por una matriz celular y dos membranas, una interna y otra externa. La primera de éstas forma unas invaginaciones en forma de cresta y funcionalmente contiene la cadena de transporte electrónico, los enzimas que sintetizan el ATP (adenosina trifosfato) y la SDH. A su vez la matriz contiene la mayor parte de los enzimas del ciclo del ácido cítrico (ciclo de Krebs), el sistema de la deshidrogenasa del piruvato, el sistema oxidativo de los ácidos grasos y muchos otros.

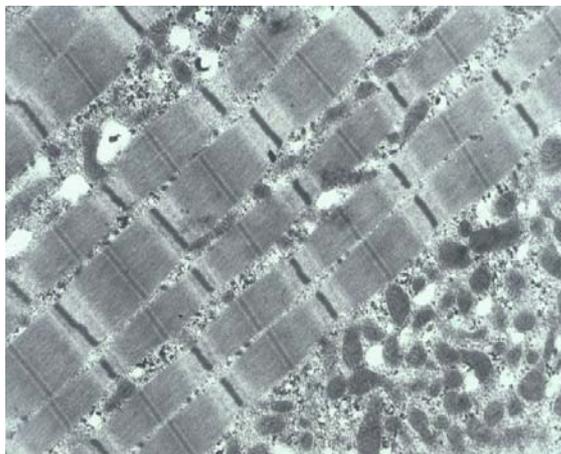


Figura 6. Mitocondrias (Extraído de Orozco-Levi 1995)

3.3 ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA FIBRA MUSCULAR ESQUELÉTICA

Son tres las principales estructuras proteicas implicadas en el sistema contráctil del músculo esquelético: miosina, actina y troponina.

Como ya se ha mencionado, las moléculas ensambladas de miosina forman los filamentos gruesos y las moléculas de actina los filamentos finos de la unidad contráctil.

3.3.1 Miosina

Las miosinas forman parte de una gran familia de proteínas conocidas como “motores” moleculares. Utilizan los filamentos de actina como puntos de anclaje para el movimiento. Por ello se definen también como motores “dependientes de la actina”.

Se distinguen dos tipos de miosinas: **filamentosas o de tipo II** y **no filamentosas o de tipo I**. Las tipo II se pueden clasificar a su vez en miosinas citoplasmáticas y musculares (Endow, Titus 1992²²).

Hay una serie de hallazgos comunes a toda miosina: una cabeza con función motora y una cola de estructura variable que puede presentar puntos de anclaje para estructuras membranosas o filamentos de actina.

La miosina está constituida por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Es, por tanto, una molécula muy larga, cilíndrica, con una cola formada por dos polipéptidos α -helicoidales (**cadena pesada, *myosin heavy chains* o MyHC**, de 220 kd) y una cabeza o porción globular con actividad enzimática (catalizar la hidrólisis del ATP). Esta porción globular

está constituida por los dos extremos aminoterminales de las cadenas pesadas de la cola y por cuatro **cadenas ligeras** (*myosin light chains* o **MyLH**, de 20 kd) plegadas en una conformación globular (Lehninger 1986²¹, Schiaffino 1994²³). El peso molecular de la miosina es de 450 kd y tiene una longitud de 160 nm. Las cadenas pesadas están constituidas por una cadena de aproximadamente 2000 aminoácidos y las ligeras por una cadena de unos 180 aminoácidos (Alberts 1994²⁴).

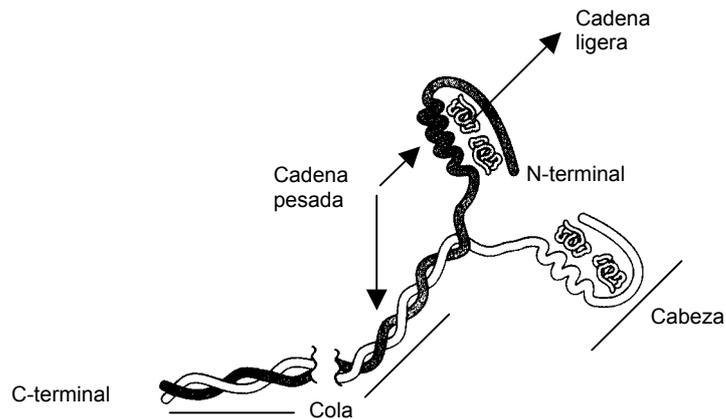


Figura 7. Esquema de las dos tipos de cadenas presentes en la molécula de miosina (Extraído de Mathews).

Todas las miosinas se caracterizan por criterios bioquímicos (una Mg ATPasa activada por la actina) o de composición aminoácida, con homologías en la secuencia de éstos a nivel de la región motora.

La velocidad de contracción de un músculo se relaciona directamente con la actividad específica de su miosina-ATPasa y sobre todo con la composición de sus MyHC. Los dos tipos de cadenas, pesadas y ligeras, conforman múltiples isoformas rápidas y lentas distribuidas en los diversos tipos de fibras, participando de esta manera en la velocidad de contracción muscular (Schiaffino 1994²³). Las cadenas pesadas son las mayores determinantes de esta propiedad, mientras que las ligeras modulan el resultado final.

Desde el punto de vista genético, las cadenas pesadas dependen de diverso genes localizados en dos *clusters*, cada uno de los cuales codifica una isoforma diferente. El gen de la isoforma lenta de la cadena pesada (MyHC-I) está ubicado tanto en los seres humanos como

en las ratas en el **cromosoma 14**. El resto de genes para las restantes isoformas (que incluyen las dos isoformas rápidas de la cadena pesada adulta IIa y IIx y las isoformas fetales y perinatales) se encuentran agrupados en el brazo corto del **cromosoma 17** en humanos y en el **cromosoma 11** en ratas (Leinwand 1983²⁵, Weydert 1985²⁶). Los seres humanos no expresan MyHC-IIb (Goldspink 1997²⁷), al contrario de los roedores y otros mamíferos de pequeño tamaño. Esto hace que sea apropiado comenzar a denominar a las fibras IIb como IIx, ya que ésta es en realidad la MyHC que expresan (ver más adelante).

Los genes de las cadenas ligeras se encuentran dispersos en diferentes cromosomas. Cada cadena ligera de miosina es codificada por un gen diferente (Barton y Buckingham 1985²⁸, Cohen-Haguenauer 1989²⁹), con excepción de las isoformas MyLC1 y MyLC3, que se originan en un solo gen (Schiaffino 1994²³).

La primera clasificación de las fibras en lentas o de tipo I y rápidas o de tipo II, subclasificadas a su vez en IIa y IIb, se basa, como ya se ha señalado, en una técnica histoquímica: la reacción de la ATPasa. Posteriormente se confirmó esta clasificación por técnicas de inmunohistoquímica, utilizando Ac específicos contra la cadena pesada de la miosina (Pieroboron 1980³⁰, Kholer 1975³¹) permite su detección por medio de Ac momoclonales.

En estudios animales con diafragma de rata y empleando un Ac monoclonal para la cadena pesada de la miosina, se pueden identificar tres tipos de fibras diferentes: I, IIa y IIb (Gurtej 1986³², Schiaffino 1986³³, 1989³⁴ y Gorza 1990³⁵). Sin embargo, y también en músculo esquelético de rata y empleando diversos Ac monoclonales contra la cadena pesada de miosina, se ha identificado un tipo adicional de fibras tipo II, las IIx. Estas últimas no son fácilmente distinguibles de las IIa y IIb por las tinciones habituales de ATPasa.

La evidencia definitiva de que la MyHC-IIx es una proteína diferente se ha podido confirmar con el aislamiento del cADN (ADN complementario), correspondiente a su ARN mensajero (De Nardi 1993³⁶).

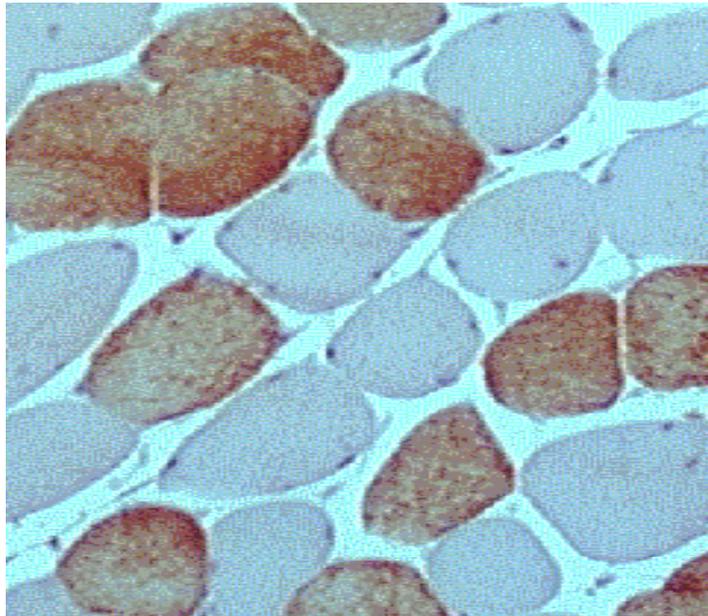


Figura 8. Ac monoclonales frente a MyCH-I y MyCH-II (imagen propia).

Las fibras tipo IIX son relativamente ricas en enzimas oxidativos (Schiaffino 1989³⁴) y algo más resistentes a la fatiga (Larsson 1991³⁷) que las IIB. Son fibras intermedias entre las IIA y IIB tanto en cuanto a la actividad oxidativa (Schiaffino 1986³³,1989³⁴), como en la resistencia a la fatiga (Larsson 1991³⁷) y velocidad máxima de acortamiento (Bottinelli 1991³⁸). A nivel del músculo esquelético humano se ha encontrado un cADN MyHC (conocido como pSMHCA) que presenta una elevada homología con el correspondiente a la MyHC-IIX de rata y una baja homología con el correspondiente a la MyHC-IIB de la misma especie (Smerdu 1994³⁹). El mismo autor ha demostrado que las fibras esqueléticas humanas tipo IIB contienen una MyHC similar a la de las fibras tipo IIX de las ratas. Estudios cuantitativos de actividad ATPasa han mostrado que las fibras humanas tipo IIX muestran una actividad enzimática comparable a las de tipo IIX en ratas (Goldspink 1997²⁷).

A partir de todo esto, se establece que en el músculo esquelético humano los transcritores de ARNm de la forma lenta de miosina o MyHC-I y de la forma rápida o MyHC-IIa y MyHC-IIX definen los grandes grupos de fibras musculares "puras", o que expresan un solo ARNm para la MyHC. Por otra parte hay dos grandes grupos de fibras "mixtas", que coexpresan respectivamente, MyHC-I y IIa, y MyHC-IIa y IIX (Smerdu 1994³⁹; Pastó 1998¹³).

Los mecanismos que regulan la expresión de los genes codificadores de las diferentes isoformas de la MyHC no son del todo conocidos. Se cree que la expresión está regulada por señales de tipo mecánico, ya que se ha observado que tanto la actividad contráctil como la estimulación eléctrica repetida provocan la inhibición de los genes codificadores de las formas rápidas y la activación de los genes codificadores de las formas lentas (Goldspink 1991⁴⁰, Gea 1997⁴¹). Parece ser que los genes para las formas rápidas de la MyHC se expresarían *por defecto*, mientras que los genes para las formas lentas lo harían como respuesta a los cambios de carga. En estudios realizados en perros se observó que la respiración con una resistencia inspiratoria moderada durante un corto período de tiempo inducía la sobreexpresión del gen de la forma lenta de miosina (MyHC-I) en los músculos respiratorios (Gea 2000⁴²). Cambios similares se producirían incluso después de períodos extremadamente cortos de estimulación (Goldspink 1991⁴⁰). No se conoce todavía la duración ni la magnitud mínima del estímulo necesarias para provocar un cambio en la expresión de las diferentes isoformas de MyHC. En seres humanos se ha visto que el entrenamiento también es capaz de inducir incrementos en la expresión de la isoforma lenta de miosina, expresado como aumento en la proporción de fibras de tipo I (Ramírez 2002⁴³).

En definitiva, el músculo esquelético puede expresar diferentes formas de miosina que vendrán determinadas por su composición en cadenas pesadas y ligeras. Estas isoformas dependen de una familia multigénica y su expresión fenotípica estará influenciada por fenómenos de diversa índole (hormonales, patrones de inervación y actividad física).

Modificando su composición de cadenas pesadas el músculo puede cambiar sus propiedades contráctiles, ya que el lugar de actuación de la ATPasa se encuentra en la cabeza de las cadenas pesadas (Goldspink 1992⁴⁴). De este modo se puede hablar de cadenas pesadas de actividad rápida y lenta "para la ATPasa", existiendo una correlación entre la velocidad de contracción intrínseca de un músculo y su contenido relativo en cadenas pesadas lenta y rápida de miosina.

3.3.2 Actina

La actina es una proteína del citoesqueleto presente en todas las células eucariotas y constituida por un solo péptido de 375 aminoácidos (Darnell 1990⁴⁵, Alberts 1994²⁴). La mayor

parte de movimientos celulares dependen de estructuras lábiles constituídas por los filamentos de actina.

La molécula de actina se puede presentar de dos formas: actina globular o actina G, y actina fibrilar o actina F. Ésta última no es más que una suma de estructuras de actina G que se asocian para formar un filamento helicoidal.

Un filamento de actina es una estructura con dos extremos estructuralmente diferentes: un extremo inerte o de crecimiento lento (*slow-growing*) conocido como el *minus end* y el extremo de crecimiento rápido (*faster-growing*) o *plus end*. Cuando los dos filamentos F de actina se enrollan entre sí se obtiene un estructura "en cordón", que corresponde al filamento delgado.

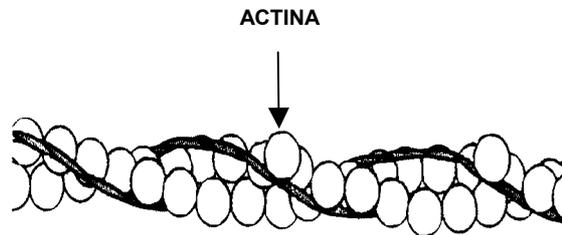


Figura 9. Filamentos de actina (Extraído de Mathews)

En cuanto a la función del filamento de actina, se sabe que existen una serie de puntos de anclaje para diferentes proteínas que le atribuyen una serie de funciones diferentes como la generación de movimiento, la adhesión a la membrana de la célula, etc.

3.3.3 Tropomiosina

Es un dímero formado por dos cadenas α -helicoidales idénticas y enrolladas, que se une a la hélice de actina estabilizándola (Lehninger 1986²¹, Alberts 1994²⁴). Este anclaje permite incrementar el espacio de la actina para su interacción con la miosina, fenómeno que se denomina *interacción cooperativa*.

Desde el punto de vista funcional la tropomiosina y, como se verá más adelante, la troponina, son proteínas accesorias que están ancladas a lo largo de la hélice de actina y se hallan involucradas en la regulación del ión calcio (Alberts 1994²⁴).

3.3.4 **Troponina**

Es un complejo constituido por tres polipéptidos: la troponina T (que posee un punto de anclaje para la tropomiosina), la troponina I (o *inhibitoria*, que se une a la actina) y la troponina C (o *reguladora* de la actividad del calcio). Las subunidades C e I forman la región globular de la cabeza, y la subunidad T la cola. Ésta última se une a la tropomiosina y parece ser la responsable de la colocación de este complejo a lo largo de los filamentos delgados. La troponina I se adhiere a la actina, y cuando se une a la troponina T y a la tropomiosina inhibe la interacción de actina y miosina a pesar de la presencia de calcio (Alberts 1994²⁴).

La troponina C, el componente del complejo sensible al calcio, consta de dos "dominios": uno aminoterminal y otro carboxiterminal. Un *dominio* está formado por cadenas polipéptídicas que se doblan formando dos o más regiones compactas, a veces unidas por un segmento de cadena polipeptídica flexible, y suele tener un contenido de 100 a 400 aminoácidos. Son codificados por partes diferenciadas de los genes conocidas como exones (Stryer 1995⁴⁶). Cada uno de los dominios contiene dos centros de unión para el calcio. Los dos centros del dominio carboxiterminal tienen una elevada afinidad por este ión, afinidad que es baja en el dominio aminoterminal (Herzberg 1985⁴⁷).

En el músculo en reposo los centros de alta afinidad de la troponina están ocupados por calcio, pero los de baja afinidad están vacíos. El calcio ocupa los centros de baja afinidad al ser liberado por el retículo sarcoplásmico, con lo que cambia la conformación del dominio aminoterminal y se hace semejante al carboxiterminal. Este cambio en la troponina C se transmite a los otros componentes del complejo de la troponina y después a la tropomiosina. La troponina T controlaría además la posición de la tropomiosina sobre el filamento delgado, cerca de la interfase entre la actina y la miosina (Stryer 1995⁴⁶).

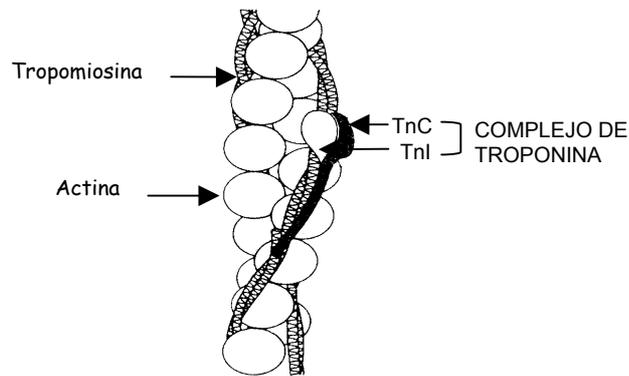


Figura 10. Complejo de troponina (Tomado de Stryer)

Estudios estructurales sugieren que en reposo, cuando la concentración de calcio es baja, el encadenamiento de la troponina I a la actina desplaza las moléculas de tropomiosina a la posición ocupada durante la contracción por la cabezas de miosina. Esto inhibe, por tanto, la interacción entre actina y miosina. Cuando aumentan los niveles de calcio en el citoplasma, la troponina C facilita la separación entre troponina I y actina permitiendo la unión de las cabezas de miosina con los filamentos de actina.

Podríamos decir pues, que la troponina es una proteína reguladora compleja, localizada a lo largo de los filamentos de actina y que actúa como una señal "iniciadora" cuando se une al calcio.

3.3.5 Otras moléculas de interés

Existen otras proteínas accesorias que contribuyen a la estructura de una miofibrilla. Una de ellas es la **α -actinina**, localizada a nivel de la región Z y que contribuye a la unión de los filamentos de actina a nivel de sus extremos *plus end*.

La **titina** es un polipéptido que se extiende desde el filamento delgado hasta la región Z.

La **nebulina** se asocia con los filamentos delgados y consiste en una secuencia repetida de 35 aminoácidos con capacidad de anclaje a la actina (Alberts 1994²⁴).

Las miofibrillas se unen unas a otras mediante filamentos de **desmina**. A su vez, todo el complejo miofibrilar se une a la membrana basal a través de diversas proteínas una de las cuales es la **distrofina**, que se mantiene anclada a la actina.

La **proteína C** es una proteína accesorias que forma parte del filamento grueso (Oakley 1980⁴⁸), uniéndose al subfragmento de miosina. Su función es doble: por un lado se une a la titina

permitiendo mantener la integridad estructural, y por otro puede modificar la actividad de la ATPasa y por tanto, la velocidad de estiramiento del músculo (Offer 1973⁴⁹, Yamamoto 1983⁵⁰).

4 FUNCIÓN DE LOS MÚSCULOS RESPIRATORIOS Y *PERIFÉRICOS*

4.1 PROPIEDADES FUNCIONALES DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO

La función contráctil de los músculos esqueléticos tiene dos características fundamentales: la **fuerza**, que depende sobre todo del número de unidades contráctiles, tamaño de las fibras (ambas condicionantes de la masa muscular) y el tipo de miosina predominante; y la **resistencia**, que depende de factores como la densidad de capilares y mitocondrias y la capacidad enzimática oxidativa, en parte ligada al tipo de miosina. El incremento de la fuerza de contracción se produce, como se ha dicho anteriormente, por mayor reclutamiento de unidades motoras (contracción de baja intensidad) y/o aumento de la tasa de activación de unidades individuales (contracción de alta intensidad). Además de esto, la función contráctil se ve modificada también por la longitud en reposo del músculo, densidad fibrilar, frecuencia del estímulo eléctrico, velocidad de contracción, disposición mecánica y conjunción molecular.

4.1.1 Propiedades funcionales de los músculos respiratorios

Los músculos respiratorios, como todos los del organismo, se evalúan teniendo en cuenta sus propiedades de fuerza y resistencia. Otras propiedades a tener en cuenta son: **potencia** (definida por el producto del trabajo por el tiempo) y **coordinación**. Ésta última característica es muy difícil de evaluar.

La **fuerza** se define como la tensión (o trabajo) máximos que un músculo puede generar en contracción máxima. En el caso de los músculos respiratorios sería la presión generada en una inspiración o espiración forzada máxima. Generalmente se evalúa durante contracciones tanto isométricas como anisométricas que, desde el punto de vista metabólico, son típicamente anaeróbicas (corta duración y alta intensidad).

Los principales determinantes de la fuerza de los músculos respiratorios son la edad, el sexo, la masa muscular, las características mecánicas de los propios músculos (sobre todo, relaciones longitud-fuerza y fuerza-frecuencia) y sus propiedades celulares y metabólicas (Report of the Respiratory Muscle Fatigue Workshop Group 1990⁵¹).

Entre las relaciones físicas citadas, cabe destacar:

La relación longitud-tensión, se basa en la existencia de una longitud para la cual la contracción muscular es óptima (L_o) (Bellemare 1987⁵², Humbayr 1989⁵³, Gea 1995⁵⁴, Pastó 1997⁵⁵). Por encima o por debajo de este valor la contracción se ve alterada. La longitud de los músculos respiratorios depende del volumen pulmonar. En el caso del diafragma, se considera que su longitud óptima es la que se obtiene después de una espiración normal, estando próxima al volumen residual (RV). Cuando existe hiperinsuflación y atrapamiento aéreo se produce un aumento del radio de curvatura del diafragma, que tiende al aplanamiento, con lo que se reduce la longitud y por tanto su capacidad contráctil.

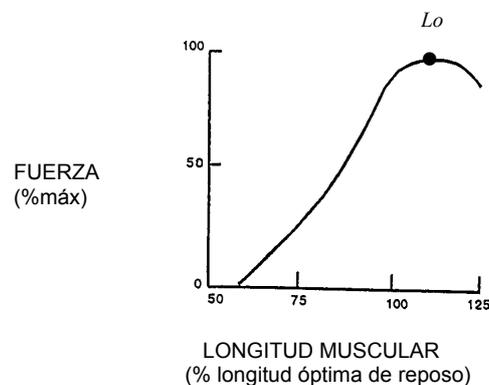


Figura 11. Relación longitud-tensión en el músculo respiratorio. L_o longitud óptima.

- La relación fuerza-velocidad: establece que para una determinada longitud del músculo, la máxima fuerza contráctil generada depende de la velocidad de contracción. Para un tipo de fibras en concreto, existe una relación inversa entre la fuerza desarrollada y la velocidad de contracción. Esto no debe confundirse con las propiedades diferenciales de los distintos tipos de fibras. Así las de contracción rápida (tipo II) son las más potentes (desarrollan más fuerza), mientras que las de contracción lenta (tipo I) son más débiles, pero resisten mejor la fatiga.

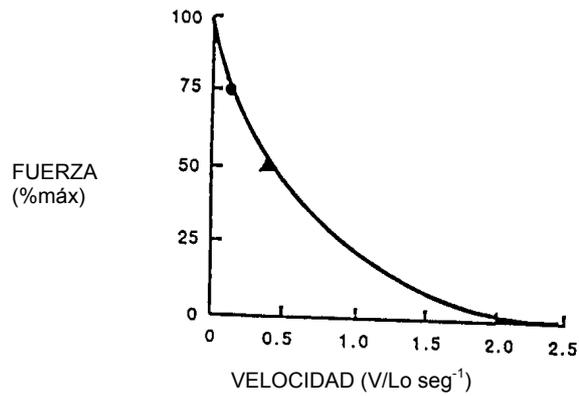


Figura 12. Relación fuerza-velocidad en el músculo respiratorio

- La relación fuerza-frecuencia: determina la capacidad muscular de incrementar la fuerza desarrollada a partir de pequeñas variaciones en la frecuencia del estímulo eléctrico. La fuerza máxima es desencadenada por frecuencias elevadas y sólo puede mantenerse unos segundos. La curva fuerza-frecuencia se desplaza hacia la derecha durante la hiperinsuflación pulmonar aguda y con la fatiga muscular.

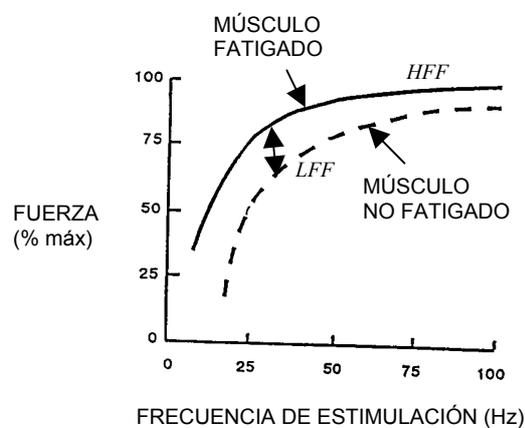


Figura 13. Relación fuerza-frecuencia en el músculo respiratorio

La **resistencia** puede definirse como el tiempo durante el cual el músculo puede generar una tensión (o trabajo) de determinada magnitud antes de fracasar mecánicamente. Se evalúa mediante maniobras dinámicas sostenidas durante períodos determinados. Desde el punto de vista metabólico son maniobras mixtas o predominantemente aeróbicas (submáximas y sostenidas), según el caso.

Los principales determinantes de la resistencia muscular son: el tipo de fibras (Report of the Respiratory Muscle Fatigue Workshop Group 1990⁵¹), relacionado con su composición en isoformas de miosina (Schiaffino 1994²³), la integridad del aparato contráctil, el aporte sanguíneo (Supinski 1988⁵⁶), la fuerza y duración de la contracción y la velocidad de estiramiento.

La **fatiga muscular** es una condición fisiológica en la cual disminuyen la fuerza y/o la velocidad contráctil ante una carga determinada. Es característicamente **reversible** con el reposo (Report of the Respiratory Muscle Fatigue Workshop Group 1990⁵¹). En el caso de los músculos respiratorios, se trata de la incapacidad del sistema para seguir generando la presión requerida para mantener una ventilación adecuada (Roussos 1982⁵⁷).

Es importante diferenciar la fatiga de la **debilidad muscular**. Esta última se define como la incapacidad **permanente** (no reversible con el reposo) del músculo para realizar un determinado trabajo contráctil (Report of the Respiratory Muscle Fatigue Workshop Group 1990⁵¹).

La fatiga de los músculos respiratorios no suele ocurrir en sujetos sanos, salvo en condiciones especiales (p.e. carrera de maratón, sobrecarga ventilatoria o estimulación frénica repetida). Sin embargo, puede aparecer en sujetos con EPOC o patologías neuromusculares, precipitando la aparición de insuficiencia ventilatoria (Macklem 1977⁵⁸), o el fracaso en la desconexión a la ventilación mecánica (Cohen 1982⁵⁹).

Los principales determinantes de la fatiga muscular son: la fuerza generada en cada contracción, la fuerza máxima del músculo, el patrón ventilatorio, el trabajo respiratorio, el aporte de oxígeno y nutrientes, la tasa de extracción de productos metabólicos, las reservas energéticas del músculo y la eficiencia de la contracción muscular (Report of the Respiratory Muscle Fatigue Workshop Group 1990⁵¹).

4.2 EVALUACIÓN FUNCIONAL

4.2.1 Evaluación de la fuerza muscular respiratoria

La fuerza de los músculos respiratorios se evalúa con maniobras respiratorias máximas. Hay dos grandes grupos de técnicas, clasificadas en función de la maniobra que se ejecute. En primer lugar, las **maniobras estáticas**, denominadas así porque no se acompañan de flujo aéreo. Permiten evaluar los músculos respiratorios durante una contracción isométrica (sin cambios en la longitud del músculo, pero con aumento en la tensión-presión generada). En segundo lugar, las **maniobras dinámicas** durante las cuales la contracción muscular se acompaña de flujo aéreo y acortamiento muscular concéntrico.

A continuación se describen con más detalle estas maniobras:

a) Maniobras respiratorias estáticas

a.1) Presiones inspiratorias y espiratorias estáticas máximas:

Se obtienen determinando las presiones máximas con oclusión simultánea de la vía aérea: maniobra de Müller (para los músculos inspiratorios) y maniobra de Valsalva (para los músculos espiratorios). Habitualmente se miden en boca, aunque también se pueden utilizar medidas de presión intratorácica.

La ejecución de estas maniobras implica una contracción muscular a isovolumen (isométrico), durante la cual se mide el cambio máximo de presión (Black y Hyatt 1969⁶⁰).

La presión inspiratoria máxima en boca ($PI, m_{máx}$) se evalúa a partir de un esfuerzo, generalmente precedido por una espiración máxima, es decir desde volumen residual (RV), aunque también puede realizarse desde capacidad residual funcional (FRC).

La presión espiratoria máxima ($PE, m_{máx}$) se evalúa generalmente tras una inspiración máxima, es decir desde capacidad pulmonar total (TLC). Al igual que la $PI, m_{máx}$, también se puede realizar desde FRC.

La ventaja de estas pruebas es que, medidas en boca, no son invasivas, son sencillas de realizar, cuentan con la posibilidad de utilizar manómetros comercializados y ya existen valores de referencia bien establecidos, calculados en base a variables antropométricas (Blach y Hyatt

1969⁶⁰, Morales 1997⁶¹) o demográficas (Wilson 1984⁶²). Sin embargo se discute su valor como maniobras suficientemente reproducibles, teniendo en cuenta los fenómenos de colaboración y el aprendizaje de la maniobra por parte del individuo (Fiz 1989⁶³). Además, no discrimina entre los diferentes músculos (p.e. diafragma frente a músculos accesorios) y pueden verse interferidas por la contracción de músculos no respiratorios (p.e. bucinadores). Con el objeto de disminuir la variabilidad individual se ha propuesto repetir las maniobras varias veces (5-6), hasta obtener valores de presión que no difieran más de un 5%. Sin embargo, esto presenta problemas de aparición de cierto grado de fatiga, sobre todo en pacientes. Asimismo debe ponerse cuidado en disminuir las fugas con boquillas especiales y controlar con las manos del investigador la utilización de la musculatura de las mejillas (Casan 1990⁶⁴).

a.2) Presión esofágica estática máxima (PI,es_{máx})

El método más utilizado para medir la presión esofágica es la colocación de una sonda-balón a nivel esofágico y conectada con un transductor de presión. Los cambios de presión esofágica (PI,es) reflejan la presión intrapleurales de tal forma que su determinación, tanto durante maniobras estáticas como dinámicas, refleja de forma global la fuerza de los músculos inspiratorios.

a.3) Presión transdiafragmática estática máxima (PI,di_{máx})

Refleja específicamente la presión generada por el diafragma. Dado que su contracción genera simultáneamente cambios de presión en el tórax (presión negativa) y abdomen (presión positiva), la diferencia entre ambas representa exclusivamente la contracción generada por el diafragma.

La medición se realiza con la colocación de dos sondas con un balón distal, uno colocado en estómago y el otro en esófago (Laporta 1985⁶⁵), que van conectadas a sendos transductores de presión. Como se ha dicho, la diferencia entre las dos presiones obtenidas (presión gástrica o PI,ga y presión esofágica o PI,es) permite cuantificar la presión transdiafragmática.

$$PI,di = PI,ga - PI,es$$

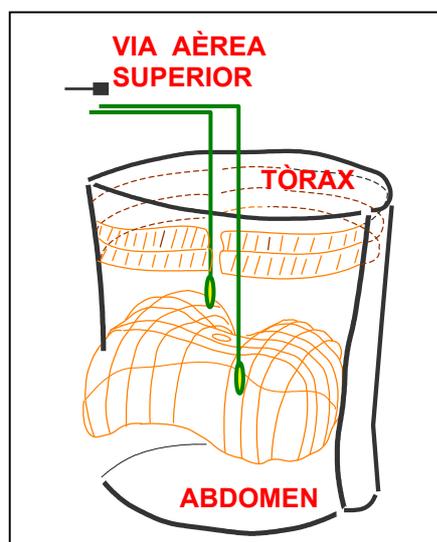


Figura 14. Esquema de colocación de las sondas para la determinación de la presión transdiafragmática

El componente esofágico permite además, evaluar en conjunto los músculos inspiratorios, mientras que el índice PI_{es}/PI_{di} reflejaría la fracción de PI_{di} que se traduce en presión pleural.

La PI_{di} se puede determinar a volumen corriente ($PI_{di_{media}}$, siempre dinámica) o durante la realización de diferentes maniobras máximas ($PI_{di_{máx}}$). Existen diversas maniobras estáticas para su obtención:

— *Maniobra de inspiración con la vía aérea cerrada*

Se denomina $PI_{di_{máx-Müller}}$. Representa la fuerza generada durante una contracción isométrica del diafragma. Consiste en realizar una inspiración forzada con la vía aérea ocluida; la inspiración se puede realizar desde volumen residual o después de una espiración normal (FRC).

— *$PI_{di_{máx}}$ por estimulación ($PI_{di_{máx-twich}}$)*

La $PI_{di_{máx-twich}}$ permite evaluar la $PI_{di_{máx}}$ con un estímulo externo (eléctrico o magnético) del nervio frénico o los centros respiratorios (Gea 1993⁶⁶), eliminando el componente voluntario del sujeto. Una ventaja adicional es que permite evaluar tanto la contracción global como la de un solo hemidiafragma según sean uno o dos los nervios

estimulados. Desde un punto de vista funcional, los valores de la $PI, di_{m\acute{a}x-twich}$ son aproximadamente un 20% menores que los de la $PI, di_{m\acute{a}x-sniff}$ (que se verá a continuación).

— *Estimulación de los músculos espiratorios*

También puede generarse presión mediante la aplicación de estímulos eléctricos o magnéticos en los centros o vías ventilatorios. Permite abolir el componente voluntario, en la evaluación de estos grupos musculares.

b) Maniobras respiratorias dinámicas

Son maniobras que se realizan con las vías aéreas permeables, y por tanto con flujo aéreo.

b.1) Maniobra de inhalación rápida con vía aérea permeable.

Consiste en una inhalación brusca, corta y forzada realizada por la nariz. Se puede medir tanto a nivel esofágico ($PI, es_{m\acute{a}x-sniff}$) como transdiafragmático ($PI, di_{m\acute{a}x-sniff}$).

Es una técnica sencilla de realizar y en enfermos con EPOC evaluados en nuestro laboratorio de función respiratoria, no se han observado diferencias importantes con respecto a la $PI, di_{m\acute{a}x-M\ddot{u}ller}$. Además parece ser la más fácil de realizar y reproducible en estos pacientes (Arán 1992⁶⁷).

b.2) Maniobra de inspiración máxima hasta capacidad pulmonar total.

Se denomina $PI, di_{m\acute{a}x-TLC}$. Requiere realizar una inspiración forzada hasta TLC. Su principal desventaja es la dificultad para su realización por parte de algunos pacientes.

b.3.) Maniobra de espiración máxima de tos voluntaria

Mediante la colocación de una sonda balón como la descrita para la medición de la PI, di , y con la realización de una tos voluntaria, se puede evaluar el esfuerzo espiratorio máximo (PI, es_{tos} , PI, gas_{tos} , PI, di_{tos}) (Gallart 1995⁶⁸).

Las principales **desventajas** de muchas de estas técnicas están representadas por el carácter invasivo y voluntario de las mismas. Para paliar lo primero, algunos autores han propuesto la medición de la $PI, m_{m\acute{a}x}$ en nariz (Héritier 1992⁶⁹), boca o nasofaringe (Mulvey 1991⁷⁰), como alternativas a la medición de la PI, es por métodos convencionales. Para abolir el

componente volitivo, como ya se ha mencionado, se utiliza la estimulación eléctrica o magnética.

4.2.2 Evaluación de la resistencia muscular respiratoria

a. Pruebas inespecíficas

— Ventilación voluntaria máxima

Es la máxima ventilación que un individuo puede mantener durante un período de al menos 15 segundos y con una frecuencia superior a 80 respiraciones por minuto (Gandevia 1957⁷¹). Es una maniobra inespecífica, pero sensible, que permite evaluar global y simultáneamente la musculatura inspiratoria y espiratoria al mismo tiempo.

— Prueba de los 6 (ó 12) minutos de marcha

Evalúa la capacidad para realizar un ejercicio general, en este caso la marcha. Se evalúa la distancia que el paciente es capaz de recorrer en un tiempo fijado, así como otras variables biológicas (saturación de oxígeno, frecuencia cardíaca y respiratoria, disnea e incomodidad en la extremidades). Es una prueba sencilla de realizar y reproducible, aunque inespecífica por los diversos factores que influyen en la tolerancia al esfuerzo. En sujetos sanos se considera como una prueba de esfuerzo submáximo, aunque en pacientes con EPOC se hallaría cercana al esfuerzo máximo (Troosters 2002⁷²). Dado que la resistencia muscular sólo es un factor limitante en un reducido número de pacientes con EPOC, su utilidad en la evaluación funcional es muy limitada.

b. Pruebas específicas de resistencia respiratoria

Consisten en aplicar selectivamente una resistencia inspiratoria. Ésta puede ser de tipo resistivo (disminución del calibre de la vía inspiratoria) o umbral (requiere una determinada presión de apertura de una válvula colocada en el circuito inspiratorio).

La técnica de carga-umbral (Nikerson y Keens 1982⁷³) consiste en una válvula a la que se pueden aplicar pesos determinados que condicionan la presión de apertura, independientemente del patrón ventilatorio. Exige que el sujeto realice una presión mínima para abrir la válvula y conseguir flujo aéreo. Al mismo tiempo se requiere una presión determinada para mantener dicho flujo.

Martyn (1987⁷⁴) introdujo una modificación en esta técnica, basándose en la observación de que determinados patrones ventilatorios permiten una mayor resistencia. Consiste en la aplicación progresiva de cargas con la adaptación ventilatoria del paciente para conseguir un rendimiento mejor. Para considerar que se ha desarrollado fracaso mecánico son necesarios, como mínimo, tres intentos fallidos del sujeto para conseguir la presión inspiratoria de apertura valvular.

Para los músculos espiratorios se dispone de una válvula, similar a la desarrollada por Nickerson y Keens, pero modificada para poder colocar cargas espiratorias. La técnica es similar a la descrita para los músculos inspiratorios, con la colocación de cargas progresivas (50 grs cada 2 minutos) hasta la claudicación. Este test permite determinar el presión espiratoria máxima ($P_{th_{m\acute{a}x}}$) (Orozco-Levi 2001⁷⁵, Ramírez 2002⁷⁶).

b.1 Presión máxima tolerada (PMT).

Es la presión inspiratoria máxima que puede soportar el individuo. En sujetos normales se acepta que debe ser próxima al 60% de la $PI_{m\acute{a}x}$.

b.2 Carga máxima tolerada (CMT).

Es la carga (grs) previa a la cual el paciente claudica durante la realización de una prueba con cargas progresivas. En las válvulas umbral su relación con la PMT es lineal.

b.3 Tiempo de resistencia ($T_{ím}$).

Se define como el tiempo durante el cual un individuo es capaz de respirar con una carga submáxima. La carga inspiratoria necesaria para definir el $T_{ím}$ debe ser superior al 60% de la $PI_{m\acute{a}x}$ (Roussos 1977⁷⁷) o al 80% de la CMT. También puede ser determinado para los músculos espiratorios.

4.2.3 Evaluación de la fatiga muscular respiratoria

Son diversas las técnicas que permiten valorar la tendencia de los músculos respiratorios a desarrollar fatiga o la propia presencia de la misma, aunque todas ellas presentan sus propias limitaciones. La evaluación de la capacidad global de los músculos respiratorios contempla tanto el patrón ventilatorio como la contractilidad.

a. Índice tensión-tiempo (TTI)

Este parámetro incluye las dos variables que determinan la capacidad de un músculo para soportar un esfuerzo ventilatorio determinado: la tensión o fuerza generada, la máxima fuerza disponible, y la duración de la contracción. Es un índice, por tanto, de la reserva funcional del músculo frente a la fatiga (Bellemare 1982⁷⁸) y se expresa como:

$$\text{TTI} = (\text{PI}_{\text{m}_{\text{media}}}/\text{PI}_{\text{m}_{\text{máx}}}) \times (\text{T}_{\text{I}}/\text{T}_{\text{TOT}})$$

donde $\text{PI}_{\text{m}_{\text{media}}}$ es la presión inspiratoria media

$\text{PI}_{\text{m}_{\text{máx}}}$ es la presión inspiratoria máxima

T_{I} es el tiempo inspiratorio

T_{TOT} es el tiempo respiratorio total

El primer cociente expresa el porcentaje de presión de reserva utilizado en cada ciclo respiratorio, de forma que su incremento representa una disminución de la reserva funcional del músculo. El segundo cociente indica la duración proporcional del tiempo inspiratorio respecto al tiempo total del ciclo respiratorio. El incremento de la fracción inspiratoria representa una disminución del tiempo de relajación muscular, disminuyendo por tanto el aporte sanguíneo (que no se produce apenas durante la contracción) y en definitiva la capacidad de resistencia del músculo.

Si se determinan los cambios de presión intratorácica con sonda esofágica la fórmula sería:

$$\text{TTI} = (\text{PI}_{\text{es}_{\text{media}}}/\text{PI}_{\text{es}_{\text{máx}}}) \times (\text{T}_{\text{I}}/\text{T}_{\text{TOT}})$$

donde $\text{PI}_{\text{es}_{\text{media}}}$ es la presión esofágica media

$\text{PI}_{\text{es}_{\text{máx}}}$ es la presión diafragmática máxima

El TTI también se denomina "índice tensión-tiempo" de los músculos respiratorios o TT_{MR} .

Esta misma fórmula también puede ser modificada para realizar la evaluación específica del diafragma:

$$TT_{di} = (PI_{di_{media}}/PI_{di_{máx}}) \times (T_I/T_{TOT})$$

donde $PI_{di_{media}}$ es la presión transdiafragmática media

$PI_{di_{máx}}$ es la presión transdiafragmática máxima

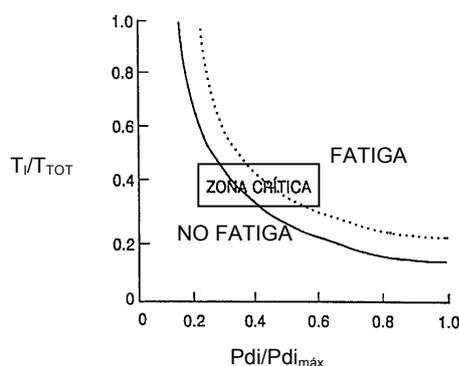


Figura 15. Representación gráfica del TTdi en sujetos normales. Zona de fatiga (TTdi > 0.15). Límite crítico de prefatiga (TTdi > 0.10). (Extraído de Bellemare).

En sujetos sanos y en condiciones basales el TTdi oscila alrededor de **0.02** (Roussos 1977⁷⁷). En pacientes con EPOC o patología neuromuscular, este valor puede ser de 2 a 5 veces mayor. A partir de trabajos experimentales se ha logrado definir que un TTdi > 0.15 es prácticamente imposible de mantener por períodos de tiempo superiores a una hora. Por ello, y aunque el TTdi no permite diagnosticar fatiga, sí permitiría valorar la situación funcional del músculo para estimar el riesgo de que desarrolle fracaso mecánico.

b. Índice de relajación máxima (MRR)

Se define como el porcentaje de caída máxima de presión, medida en los primeros 100 mseg de la relajación muscular. Se considera uno de los indicadores más precoces de los cambios que suceden en la dinámica de la fatiga muscular (Mudley 1991⁷⁹). Se basa en el

hecho fisiológico de que la relajación muscular es un fenómeno activo, que también consume energía, y es lábil a las modificaciones del medio intracelular (pH, niveles de ATP, etc).

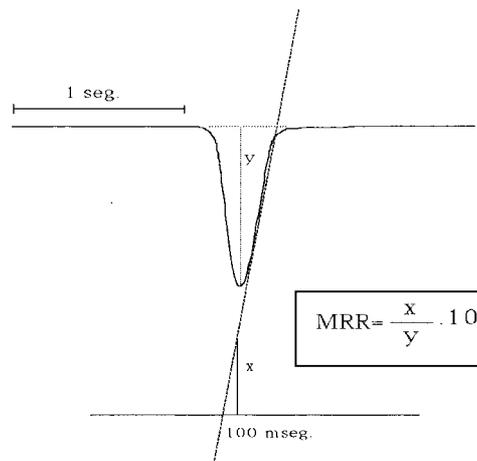


Figura 16. Representación gráfica del MRR.

c. Electromiografía

La valoración del índice de altas/bajas frecuencias (índice H/L) medido sobre la señal electromiográfica es uno de los métodos clásicos para detectar fatiga. Cuando el diafragma tiende a desarrollarla predominan las frecuencias bajas (Moxham 1982⁸⁰), con una inversión del índice H/L.

Se ha estudiado además el efecto del volumen pulmonar en el electromiograma. La relación volumen-activación del diafragma se ve afectada tanto por cambios en el volumen pulmonar como por la relación volumen-Pdi (60% de cambio desde FRC hasta TLC). En cambio, la raíz media cuadrada (*root mean square*) de la señal del electromiograma diafragmático no se ve afectada por el volumen pulmonar y podría, por tanto, ser un índice válido de activación diafragmática (Beck 1998⁸¹). Los pacientes con EPOC grave se caracterizan por un incremento en la activación diafragmática aunque sin cambios en la presión generada (Sinderby 1998⁸²).

5 FENÓMENOS ADAPTATIVOS EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO

Se conoce como **entrenamiento o condicionamiento** la capacidad de un ser vivo para **adaptarse** (afrontar en mejores condiciones) a períodos de ejercicio por un tiempo relativamente prolongado. Se han diferenciado dos categorías de adaptación, basadas en la rapidez y la duración de los cambios:

- **Respuestas agudas** son aquellas alteraciones celulares, tisulares, de órgano y sistémicas que ocurren en un corto intervalo de tiempo
- **Respuestas adaptativas** que son aquellos cambios más tardíos que **persisten** por períodos de tiempo apreciables después del estímulo (ejercicio o entrenamiento físico).

La función de la adaptación a la sobrecarga muscular crónica parece ser el disminuir la disrupción de la homeostasis durante la realización de un ejercicio determinado. Este mantenimiento del medio interno mediante la adaptación favorecería la efectividad funcional del organismo. De hecho, permite realizar un trabajo físico con mayor fuerza o durante períodos de tiempo más prolongados antes de desarrollar fatiga.

La sobrecarga muscular intensa (> 70% de la capacidad máxima) hace que el músculo esquelético aumente su volumen. Este fenómeno se conoce como **hipertrofia**. Los diámetros de cada fibra aumentan a expensas del número total de miofibrillas. Esto junto al incremento, como veremos más tarde, de ATP, fosfocreatina, glucógeno y enzimas glicolíticas, se traduce funcionalmente en un incremento tanto del poder motor del músculo como de los mecanismos de producción de energía. Es interesante señalar que el músculo no aumenta el número de fibras (hiperplasia), sino sólo su tamaño. Cuando la sobrecarga muscular es ligera, aunque persista por largo tiempo, no induce hipertrofia y por tanto aumento de fuerza. Sin embargo, puede incrementar la actividad de sus enzimas oxidativas, densidad mitocondrial, número de capilares y proteínas "resistentes a la fatiga".

El fenómeno inverso al entrenamiento se denomina **desacondicionamiento o decondicionamiento** y lleva a la **atrofia muscular**. Se instaura cuando el músculo no se utiliza o se utiliza poco, se denerva, o se produce desnutrición proteico-calórica. También algunos fármacos pueden inducir miopatía con tendencia a la atrofia (p.e. esteroides).

5.1 ADAPTACIÓN DE LOS MÚSCULOS RESPIRATORIOS EN LA ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC)

Son varios los factores que determinan la sobrecarga de los músculos respiratorios en la EPOC: por una parte los cambios mecánicos inducidos por la hiperinsuflación, y por otra el aumento del trabajo respiratorio. También tiene importancia el factor nutricional (es decir, el potencial desequilibrio entre aporte y demanda de nutrientes al músculo), así como otra serie de factores tanto locales como sistémicos que analizaremos a continuación.

5.1.1 Hiperinsuflación

La hiperinsuflación característica de la EPOC coloca al diafragma en una posición de desventaja por varias razones:

a) se produce un acortamiento de la longitud muscular desviándose hacia longitudes menos operativas para la contracción. Esto es debido a la alteración en la geometría diafragmática, con modificación del radio de curvatura. Según la **ley de Laplace ($P_{di} = 2T_{di}/R_{di}$)**, el radio de curvatura es un determinante de la capacidad muscular para generar presión transdiafragmática, por lo que ésta disminuye cuando el radio aumenta.

Sin embargo la presencia de hiperinsuflación pulmonar crónica induce un fenómeno adaptativo, con acortamiento de las propias sarcómeras del diafragma (Orozco-Levi 1995⁸³). La disminución en el tamaño de las sarcómeras adaptaría la longitud óptima del músculo a una menor longitud y permitiría restaurar parcialmente la función contráctil a pesar de la hiperinsuflación (Smilowsky 1991⁸⁴).

b) Genera un mayor trabajo de los músculos inspiratorios ya que supone una carga adicional. Además, debido a que horizontaliza las costillas, dificulta la acción de los intercostales externos para expandir la caja torácica. Se ha observado que los intercostales presentan fibras de mayor tamaño, con un incremento en el porcentaje de las tipo II en esa situación (Aguar 1995¹⁵). Estos cambios estarían relacionados con las cargas que estos últimos músculos soportan en los pacientes con EPOC y podrían incrementar el poder de contracción durante el esfuerzo respiratorio (Gea 1996⁸⁵).

c) Tiene un efecto perjudicial sobre el aporte sanguíneo. Para conseguir presiones inspiratorias adecuadas se requieren contracciones de una duración que puede alterar

mecánicamente este aporte. Sin embargo los pacientes con EPOC presentan un incremento en el número de capilares tanto en el diafragma (Orozco-Levi 1996⁸⁶) como en el intercostal (Jiménez-Fuentes 1999⁸⁷), lo que podría contrarrestar parcialmente el deficiente aporte sanguíneo durante la contracción.

5.1.2 Aumento del trabajo respiratorio

Éste deriva de la suma de cargas resistivas (resistencia de la vía aérea), umbrales (PEEP intrínseca) y elásticas (parénquima y caja torácica).

El músculo respiratorio, a diferencia del resto de músculos esqueléticos, es capaz en situación basal de mantener indefinidamente la contracción contra la resistencia del sistema. Como ya se ha mencionado en el punto anterior, en la EPOC esta resistencia está aumentada en situación basal, por lo que son mayores el trabajo respiratorio y el coste energético. Por otro lado se encuentran disminuídas la reserva ventilatoria (Rochester 1979⁸⁸) y la reserva diafragmática (Bellemare y Grassino 1983⁸⁹), al estar incrementado el nivel de fuerza desarrollada durante cada inspiración en relación con la fuerza muscular máxima. El umbral de fatiga es, sin embargo, superior al de los sanos: 0.20 vs 0.15 respectivamente (Bellemare y Grassino 1983⁸⁹).

El incremento del trabajo respiratorio provoca el reclutamiento de otros grupos musculares para evitar el fracaso de la bomba ventilatoria, como se ha demostrado en humanos con la aplicación de cargas umbrales progresivas respiratorias (Orozco 1995⁹⁰) o con la realización de maniobras inspiratorias máximas repetidas (Sharp 1975⁹¹).

Finalmente, el consumo de oxígeno de los propios músculos respiratorios, derivado del aumento del trabajo, ha demostrado ser el factor más importante de hipoxemia en los pacientes con EPOC durante las descompensaciones (Barberá 1997⁹²).

5.1.3 Alteración del estado nutricional

La EPOC, en fases avanzadas, se acompaña de fenómenos de malnutrición. En humanos se ha demostrado una relación entre la pérdida de peso corporal, disminución de masa muscular y pérdida de fuerza diafragmática (Arora 1982⁹³, Lewis 1988⁹⁴). Los efectos de esta malnutrición sobre las fibras de tipo II serían de mayor magnitud que sobre las fibras de tipo I. La mayor atrofia de las fibras de tipo II determina que una mayor área muscular esté

compuesta por fibras lentas de metabolismo oxidativo, cuya resistencia a la fatiga es mayor. La alta capacidad oxidativa de las fibras tipo I puede considerarse como una adaptación metabólica en el proceso de sustitución de la glucosa por ácidos grasos como sustrato energético. En este sentido, se ha demostrado que en sujetos sanos y durante el ejercicio se produce una predominante combustión de ácidos grasos, en relación al mayor porcentaje de fibras tipo I (Wade 1990⁹⁵). Para explicar estos fenómenos se han invocado factores tales como el elevado trabajo respiratorio y más recientemente la existencia de elementos deletéreos circulantes que podrían favorecer el catabolismo muscular (p.e. el factor de necrosis tumoral o TNF- α). Este último condicionante, a diferencia de los dos anteriores, es sistémico, por lo que afectaría también a los demás músculos del organismo. De hecho, hoy en día se habla de la existencia de una "miopatía periférica" en la EPOC.

5.1.4 Inflamación y estrés oxidativo

La inflamación, local o sistémica, es característica de la EPOC e intensifica el estrés oxidativo. Influye sobre muchos procesos celulares, como el metabolismo de los carbohidratos, la homeostasis del calcio y la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Otra forma de estrés oxidativo, no relacionada con la inflamación, se ha descrito en el músculo esquelético atrofiado por la inmovilización. En este caso se produce un descenso en el contenido de glutatión total celular, con incremento en las concentraciones de glutatión oxidado y peroxidación lipídica.

La hipoxia por sí misma también puede contribuir al estrés oxidativo. Así se ha observado un incremento de la actividad oxidante y antioxidante en el músculo de ratas expuestas a hipoxia intermitente o en pacientes expuestos a hipoxia aguda. La hipoxia hace que el tejido muscular sea más vulnerable al estrés oxidativo, con una alteración en la generación de ATP y un mayor acúmulo de inosina monofosfato (IMP).

La vitamina E, con efecto antioxidante, parece atenuar los efectos oxidativos tanto derivados de la atrofia muscular como de la hipoxia, lo que apoya la teoría del papel que el estrés oxidativo juega a nivel muscular (ATS/ERS 1999⁹⁶).

Es importante señalar que en los paciente con EPOC coexisten a menudo otra serie de condiciones "generales" como alteraciones electrolíticas, fallo cardíaco, diabetes e hipertensión, que también pueden afectar a la función del músculo esquelético. Sin embargo, no está claro si el efecto de estos factores a nivel muscular en pacientes con EPOC es diferente del que tiene en otros pacientes no afectados de esta enfermedad.

También es importante señalar la potencial influencia de fármacos, fundamentalmente los corticoides. Éstos inducen a nivel muscular una verdadera miopatía, con atrofia muscular global e incremento del tejido conectivo entre fibras. Los corticoides inhibirían, entre otras acciones, el factor de crecimiento *insulin-like* (IGF-1), lo que disminuiría la síntesis de proteínas e incrementaría la proteólisis intracelular en el músculo esquelético (ATS/ERS 1999⁹⁶).

5.2 ADAPTACIÓN DE LOS MÚSCULOS PERIFÉRICOS EN LA EPOC

Varios estudios han puesto de manifiesto cambios, tanto funcionales como estructurales, en los músculos periféricos (o de las extremidades) en los pacientes con EPOC. La mayoría de ellos se han centrado en los grupos musculares de las extremidades inferiores, al considerar que podrían ser el grupo más determinante en la limitación funcional de estos pacientes durante el esfuerzo. Así, se ha demostrado que la fuerza de las piernas está disminuída en los pacientes con EPOC (Hamilton 1995⁹⁷, Gosselink 1996⁹⁸). Ésto se asocia directamente con la distancia recorrida en la prueba de la marcha de 6 minutos, la gravedad de los síntomas durante una prueba de esfuerzo incremental y la capacidad máxima de consumo de oxígeno (Hamilton 1995⁹⁷).

Recientemente se ha demostrado que los pacientes con EPOC presentan también una menor fuerza en los músculos de las manos (Gosselink 1998⁹⁹). Esta alteración no sólo se asocia a la presencia de EPOC sino también a su gravedad. Este último hecho sería quizás justificable por la probable existencia de un factor con efecto sistémico responsable de esta disfunción. Sin embargo, la magnitud del descenso de la fuerza en extremidades superiores es menor que en las inferiores, lo que sugiere la presencia de factores locales que se sumarían a los sistémicos.

Característicamente el cuádriceps de los pacientes con EPOC presenta una menor masa muscular (Wuyam 1992¹⁰⁰), atrofia de las fibras (Hughes 1983¹⁰¹), disminución del porcentaje

de fibras de tipo I (Hildebrand 1991¹⁰²) e incremento en la isoforma de miosina tipo IIb o IIa (Satta 1997¹⁰³, Maltais 1999¹⁰⁴) si se compara con el de sujetos sanos. Se ha visto que el contenido en isoformas de miosina se correlaciona directamente con el grado de obstrucción. Así en los pacientes con mayor gravedad ($FEV_1 < 40\%$) predominan fundamentalmente las fibras de tipo IIa (Maltais 1999¹⁰⁴). Tienen además un menor contenido en capilares y menor concentración de mioglobina, aunque el contenido mitocondrial parece normal (Simard 1996¹⁰⁵). En cuanto a la capacidad metabólica de sus enzimas, ésta es menor en el caso de las aeróbicas y no se modifica en las principales anaeróbicas (especialmente LDH, lactato deshidrogenasa y HK, hexoquinasa), aunque aumenta la de la PFK, fosfofructoquinasa (Jakobsson 1995¹⁰⁶).

A nivel de las extremidades superiores, en concreto, del deltoides, nuestro grupo ha demostrado que las fibras musculares de los pacientes con EPOC conservan un diámetro normal y una proporción fibrilar similar a los individuos con función pulmonar normal. También mantiene conservada la actividad enzimática (tanto oxidativa como glicolítica) (Pastó 1998¹³). Son pocos los estudios realizados sobre otros músculos periféricos en la EPOC. Se ha descrito a nivel del bíceps, que el porcentaje de fibras no se modifica, aunque es evidente la presencia de atrofia tanto en las fibras de tipo I como de tipo II en relación tanto con la pérdida de peso como con el grado de obstrucción al flujo aéreo (Sato 1997¹⁰⁷).

6 METABOLISMO Y ENERGÍA

Se entiende por metabolismo el conjunto de reacciones químicas mediante las cuales las células obtienen energía y sintetizan los componentes fundamentales de sus macromoléculas.

El metabolismo puede subdividirse en dos categorías principales: **catabolismo** o conjunto de procesos relacionados con la degradación de sustancias complejas, con obtención de energía y **anabolismo** o procesos relacionados con la síntesis de moléculas complejas. Las rutas de producción de energía generan también intermediarios que se utilizan en los procesos de biosíntesis. Por tanto, muchas de las reacciones metabólicas desempeñan funciones en ambos tipos de procesos.

Los seres vivos necesitan una producción continuada de energía para cuatro fines fundamentales:

- realización del trabajo mecánico propio de la contracción muscular y otros movimientos celulares
- transporte activo de iones y moléculas
- síntesis de macromoléculas y otras biomoléculas a partir de precursores más sencillos
- mantenimiento de la temperatura corporal

Aunque los microorganismos presentan adaptabilidad con respecto a su capacidad de sobrevivir en ausencia de oxígeno, prácticamente todos los organismos multicelulares y muchas bacterias son organismos **aerobios** estrictos. Es decir, dependen por completo de la **respiración** (acoplamiento de la generación de energía con la oxidación de nutrientes). En cambio, otros muchos organismos pueden crecer en medios **anaerobios**, y obtienen su energía metabólica de procesos en los que no interviene el oxígeno molecular (Leningher1986²¹, Mathews1998¹⁰⁸).

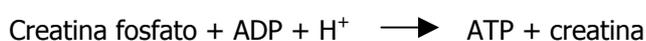
6.1 El ATP como fuente de energía

En la mayor parte de los procesos que requieren energía, el donante es el **adenosin trifosfato (ATP)**. El ATP es un nucleótido que consta de una adenina, una ribosa y una unidad trifosfato. Es una molécula rica en energía porque su unidad trifosfato contiene dos enlaces anhídrido fosfórico. Su forma activa es normalmente un complejo del ATP con Mg^{2+} o Mn^{2+} .

Cuando se hidroliza hacia adenosina difosfato (ADP) y fósforo (Pi) o hacia adenosina monofosfato (AMP) y pirofosfato (PPi), se desprende una gran cantidad de energía libre. Esta energía liberada en la hidrólisis del ATP se utiliza para impulsar reacciones que requieran aporte de energía libre, como la contracción muscular.

6.2 Otras fuentes de energía en el músculo esquelético

El músculo de los vertebrados contiene un reservorio de grupos fosforilo de alto potencial en forma de creatina fosfato, también llamada **fosfocreatina**. Ésta puede transferir fácilmente su grupo fosforilo al ADP. La fosfocreatina se sintetiza a partir de creatina y ATP en una reacción catalizada por la **creatin fosfoquinasa**.



A continuación difunde desde las mitocondrias a las miofibrillas, donde proporciona la energía necesaria para la contracción. Las concentraciones elevadas de ADP que se forman en las miofibrillas durante la contracción favorecen la reacción inversa. Es decir, la nueva síntesis de ATP, a costa de la ruptura de la creatina fosfato a creatina.

A pH de 7, la energía libre estándar de la hidrólisis de la creatina fosfato es **-10.3 kcal/mol**, en comparación con las **-7.3 kcal/mol** del ATP. La abundancia de creatina fosfato y su elevado potencial de transferencia de fosforilación con respecto al ATP, convierten a este compuesto en un amortiguador de fósforo muy eficaz. La creatina fosfato mantiene una concentración de ATP alta durante los períodos de ejercicio. En realidad es la principal fuente de fosfato que utilizaría, por ejemplo, un corredor de velocidad durante los primeros 4 segundos de una carrera de 100 metros (Stryer 1995⁴⁶).

La energía, tanto si se almacena en forma de ATP como en forma de creatina fosfato, debe estar disponible en forma química (para la síntesis de otros compuestos de alta energía), o en forma de energía mecánica o eléctrica. La transducción en energía mecánica se produce durante la contracción muscular o el movimiento de los cilios, mientras que la transducción en energía eléctrica se produce en la despolarización de la membrana o en el bombeo de iones a través de ésta.

El músculo esquelético en reposo, tiene suficiente cantidad de fosfocreatina para satisfacer sus necesidades de energía libre durante varios minutos. Sin embargo, durante el esfuerzo máximo, la cantidad de ATP sólo es suficiente para mantener la actividad contráctil durante una fracción de segundo (Voet 1990¹⁰⁹; Stryer 1995⁴⁶).

Las principales fuentes energéticas son azúcares, proteínas y ácidos grasos, que se metabolizan a través de dos rutas fundamentales: **glicólisis y ciclo del ácido cítrico**.

A continuación veremos de forma detallada cada una de estas dos vías metabólicas.

6.3 GLICÓLISIS (Figura 17)

La glicólisis es la secuencia de reacciones que convierte la glucosa en piruvato, con producción de cantidades relativamente escasas de ATP. Se conoce también con el nombre de **ruta de Embdem-Meyerhof**. En condiciones aeróbicas el piruvato entra en la mitocondria donde es completamente oxidado, obteniéndose CO₂ y H₂O. Si el suministro de oxígeno es insuficiente, como ocurre con frecuencia en el músculo en contracción, el piruvato se convierte en lactato. Las reacciones de este ciclo se producen en el citosol de la célula. El citosol es un gel casi líquido que contiene en disolución o suspensión sustancias tales como enzimas, inclusiones citoplasmáticas y todos los orgánulos. Actúa como tampón que equilibra el pH celular.

La glicólisis es una ruta de 10 pasos que convierte una molécula de glucosa en dos de piruvato, con la generación de dos moléculas de ATP. Este conjunto de reacciones se agrupan en dos fases distintas:

- Las cinco primeras reacciones constituyen la **fase de inversión de energía**, en la que se sintetizan azúcares-fosfato a costa de la conversión de ATP en ADP y el sustrato glicídico de seis carbonos se desdobra en dos azúcares-fosfato de tres carbonos.
- Las cinco últimas reacciones corresponden a la **fase de generación de energía**, en la que las triosas-fosfato se convierten en compuestos ricos en energía, que transfieren fosfato al ADP dando lugar a la síntesis de ATP. El rendimiento neto por

mol de glucosa metabolizado, es dos moles de ATP y 2 de piruvato (Mathews 1998¹⁰⁸).

La degradación de glucosa a lactato proporciona energía suficiente ($\Delta G^{\circ} = - 47 \text{ Kcal/mol}$) para provocar la fosforilación de dos moléculas de ATP ($\Delta G^{\circ} = + 14.6 \text{ Kcal/mol}$). El proceso global de la glicólisis, aún después de descontar la formación acoplada de ATP, se realiza todavía con un descenso neto de energía libre muy grande, (- 32.4 Kcal/mol). Es, por tanto, una vía esencialmente unidireccional e irreversible, cuyo equilibrio está desplazado en la dirección de la formación de lactato (Leningher 1986²¹).

Una gran proporción del lactato acumulado al inicio de un ejercicio se asocia más con un retraso en la activación de la producción de ATP que con un retraso en el aporte de oxígeno (Greenhaff 1998¹¹⁰).

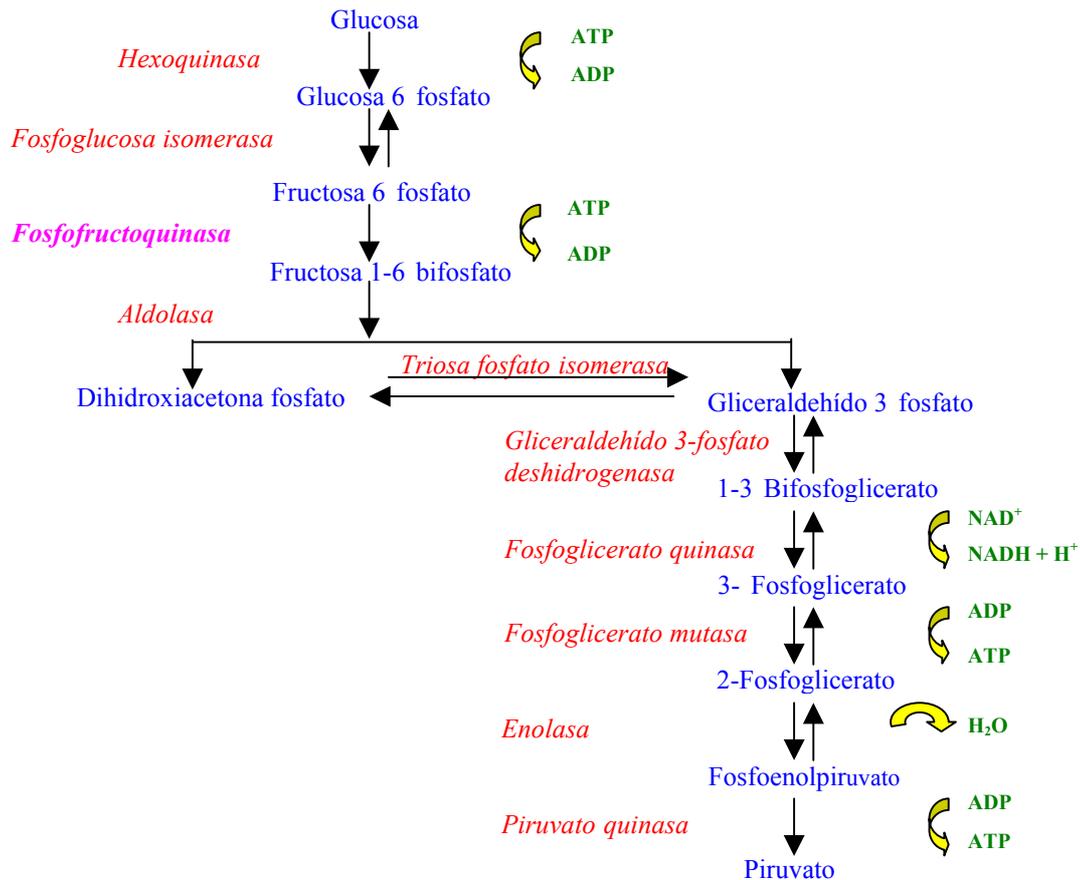
En los organismos aerobios, y en presencia de oxígeno, la glicólisis es el primer paso en la combustión completa de la glucosa a CO₂ y H₂O. El segundo paso es la oxidación del piruvato a acetil CoA, y finalmente la oxidación de los carbonos del grupo acetilo en el ciclo denominado del ácido cítrico, como veremos más adelante. La glicólisis da lugar también a intermediarios biosintéticos. Por tanto es una vía tanto anabólica como catabólica, cuya importancia va más allá de la síntesis de ATP y sustratos para el ciclo del ácido cítrico. Se cree que los enzimas individuales que catalizan las diferentes etapas de la glicólisis no dependen físicamente unos de otros. Es decir, no están asociados formando complejos multienzimáticos estables. En diferentes tipos celulares, algunos enzimas pueden hallarse asociados a la membrana plasmática, a las miofibrillas o a las mitocondrias (Mathews 1998¹⁰⁸).

Todos los intermediarios de la glicólisis son compuestos fosforilados y sus grupos fosfato desempeñarían tres funciones: proveer a cada intermediario de un grupo polar cargado negativamente y que le impide pasar a través de la membrana celular, actuar como grupos enlazantes en la formación de complejos enzima-sustrato, y la más importante, la conservación de energía (ya que finalmente se transformarán en el grupo fosfato terminal del ATP) (Lehninger 1989²¹).

La glicólisis es independiente del grado de oxigenación y del *feed-back* metabólico, pero es proporcional a la activación muscular. Es decir, ésta última es el mecanismo clave de

estimulación y mantenimiento del proceso de la glicólisis (Conley 1998¹¹¹). Esta dependencia de la estimulación y su independencia de los niveles de metabolitos es consistente con la observación de que el Ca^{2+} es el factor que controla la glicólisis. (Cooley 1997¹¹²).

Figura 17. CICLO DE LA GLICOLISIS



Es importante destacar que la fosfofructoquinasa (PFK) es el elemento de control más importante de la vía glicolítica en los mamíferos. Este enzima es inhibido por niveles altos de ATP, que hacen disminuir su afinidad por la fructosa-6-fosfato. La acción inhibitoria del ATP es contrarrestada por el AMP, de modo que la actividad enzimática aumenta cuando disminuye la relación ATP/AMP. Es decir, cuando la carga de energía es baja, la glicólisis se estimula. Sin embargo, se inhibe cuando el pH desciende bruscamente, lo que evita la formación excesiva de lactato y la consiguiente aparición de acidosis (Stryer 1995⁴⁶).

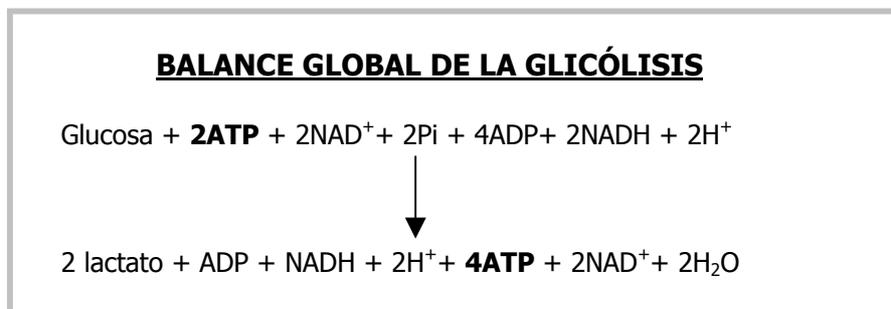
La glicólisis también suministra sustrato para la biosíntesis, de modo que la PFK se va a ver inhibida por el citrato, uno de los compuestos iniciales del ciclo del ácido cítrico. Un nivel elevado de citrato significaría que los precursores abundan, y por tanto no debe degradarse más glucosa con ese fin. El citrato inhibe, por tanto, la PFK potenciando también el efecto inhibitorio del ATP (Stryer 1995⁴⁶).

En la primera fase de la glicólisis (hasta la formación de gliceraldehído-3-fosfato) se ha producido la transformación de una molécula de glucosa en dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato, sin extracción energética. Por el contrario, **se han consumido dos moléculas de ATP (!)**. Las etapas siguientes tendrán como fin metabolizar las moléculas de gliceraldehído-3-fosfato para producir compuestos de alta energía que determinen **la síntesis de nuevo ATP**.

El NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido) es el principal agente oxidante de la glicólisis. Desempeña el papel de transportador de electrones desde el gliceraldehído-3-fosfato, que los cede, hasta el piruvato, que se formará más tarde en la ruta glicolítica (Lehninger 1989²¹).

La regeneración del NAD⁺ en la reducción del piruvato hasta lactato o etanol impide que la glicólisis tenga que pararse en condiciones anaeróbicas. Si el NAD⁺ no se regenerase, la glicólisis no proseguiría más allá del gliceraldehído-3-fosfato, lo que significa que no podría generarse más ATP.

Sólo una pequeña fracción de energía se obtiene en la conversión anaeróbica en lactato. Se extrae mucha más energía de forma aeróbica, por la vía del ácido cítrico y la cadena de transporte electrónico, como veremos más adelante.



6.4 CICLO DEL ÁCIDO CÍTRICO (Figura 19)

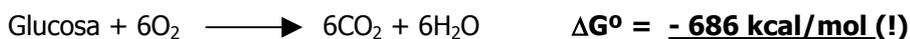
También se denomina **ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs**. Es la ruta oxidativa central de la respiración celular y un proceso mediante el cual se metabolizan todos los combustibles metabólicos (hidratos de carbono, lípidos y proteínas) en los organismos y tejidos.

Aunque la respiración celular y la glicólisis generan entre ambas aproximadamente el 40% de la energía liberada en forma de ATP, en la glicólisis se produce una energía total mucho menor. El lactato, como otros productos terminales del catabolismo anaerobio de los hidratos de carbono, tiene el mismo grado de oxidación que la molécula de partida, la glucosa. Por tanto, la energía potencial almacenada es escasa. Se genera mucha más energía (hasta quince veces más) cuando el lactato o piruvato se oxidan por completo hasta CO₂. Esta liberación de energía implica reacciones de deshidrogenación que generan transportadores electrónicos reducidos, principalmente NADH. Estos transportadores se reoxidan posteriormente en la cadena respiratoria mitocondrial. Tales reacciones aportan la energía necesaria para la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa como veremos posteriormente. Los electrones liberados se transfieren finalmente al oxígeno, que se transforma en agua (Mathews 1998¹⁰⁸).

GLICÓLISIS



OXIDACIÓN COMPLETA



El proceso de oxidación metabólica tiene tres etapas: la **primera etapa** consiste en la generación de un fragmento activado de dos carbonos, el grupo acetilo de la acetil-coenzima A o **acetil-CoA**. Éste es el producto común de la degradación de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos. El carbono procedente de los glúcidos entra en esta etapa en forma de piruvato, que se transforma en acetil-CoA por la acción de la **piruvato deshidrogenasa**. La degradación de las grasas genera acetil-CoA mediante la β -oxidación de los ácidos grasos, mientras que son varias las rutas que generan acetil-CoA a partir del catabolismo de los aminoácidos.

La **segunda etapa** consiste en la oxidación de esos dos átomos de carbono en el propio ciclo del ácido cítrico.

Finalmente la **tercera etapa** es la del transporte electrónico y fosforilación oxidativa, donde los transportadores electrónicos reducidos que se han generado en el ciclo vuelven a oxidarse junto con la síntesis de ATP.

Las reacciones enzimáticas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos tienen lugar en el **compartimento interno de la mitocondria** a diferencia de la glicólisis que tiene lugar en el citosol. Algunos de los enzimas se encuentran en la matriz mitocondrial, mientras que otros se hallan ligados a la membrana mitocondrial interna (los correspondientes al transporte electrónico y a la fosforilación oxidativa) (Mathews 1998¹⁰⁸).

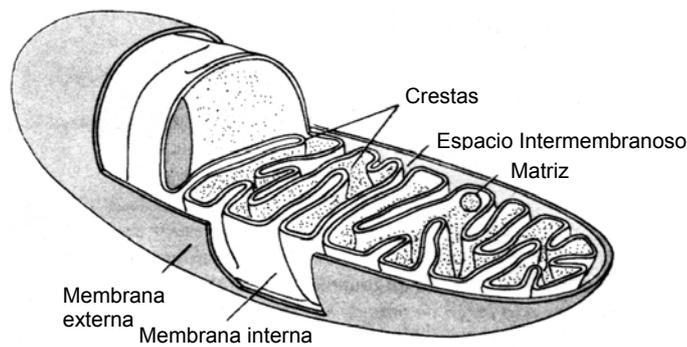
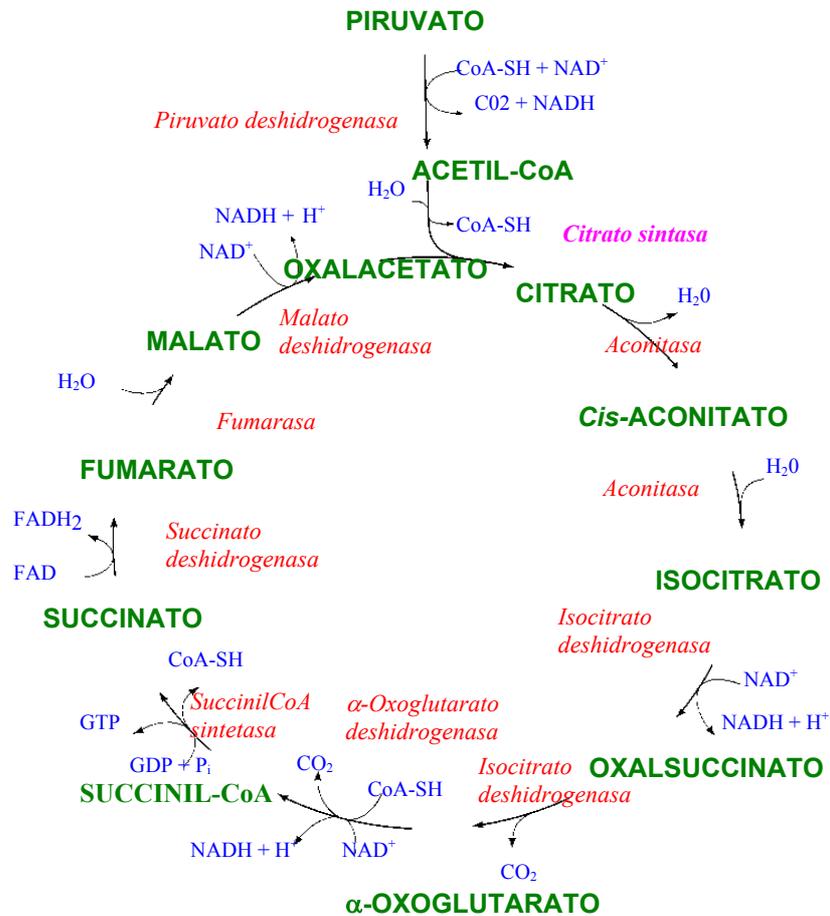


Figura 18. Esquema de la mitocondria (extraído de Stryer)

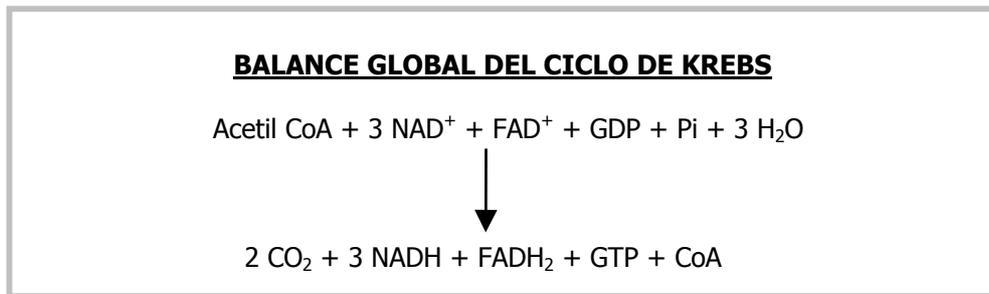
Figura 19. CICLO DEL ÁCIDO CÍTRICO



La mayoría de moléculas combustibles entran en este ciclo como acetil-CoA. La descarboxilación oxidativa del piruvato para formar acetil-CoA es el eslabón entre la glicólisis y el ciclo del ácido cítrico.

El ciclo comienza en realidad con la unión de una unidad de cuatro carbonos, el oxalacetato, con una unidad de dos carbonos, el grupo acetilo del acetil-CoA, para producir citrato y CoA. Esta reacción, una condensación aldólica seguida de una hidrólisis, es catalizada por la **citrato sintasa (CS)**. La reacción de la citrato sintasa es la **primera etapa condicionante de la velocidad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos**. Su velocidad viene determinada por la disponibilidad de acetil-CoA y oxalacetato, así como por la concentración de succinil-CoA, que compite con el acetil-CoA inhibiendo la enzima. Resulta frenada por el ATP.

El **segundo punto de control del ciclo de Krebs** se produce en el paso de isocitrato a α -cetoglutarato, catalizado por la isocitrato deshidrogenasa. El último punto de control es el complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa que interviene en la formación de succinil CoA (Stryer 1995⁴⁶).



El balance general es el siguiente:

- en la condensación de una unidad de acetil CoA con oxalacetato entran en el ciclo dos átomos de carbono. En las descarboxilaciones sucesivas catalizadas por la isocitrato deshidrogenasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa salen del ciclo otros dos átomos de carbono en forma de CO_2 .
- en las cuatro reacciones de oxidación salen del ciclo cuatro pares de átomos de hidrógeno. En las descarboxilaciones oxidativas sucesivas del isocitrato y del α -cetoglutarato se reducen dos moléculas de NAD^+ . En la oxidación del succinato se reduce una molécula de FAD^+ (flavina adenina dinucleótido), y en la oxidación del malato otra de NAD^+ .

El NADH y FADH_2 formados en el ciclo del ácido cítrico se oxidan mediante la cadena del transporte electrónico. La transferencia de electrones desde estos transportadores al O_2 , receptor final de electrones, conduce al bombeo de protones a través de la membrana interna mitocondrial. Se crea entonces una fuerza protomotriz que potencia la generación de ATP. Sólo se forma de modo directo un enlace fosfato de alta energía por cada unidad de acetilo que entra en el ciclo de Krebs. En cambio, cuando se oxidan tres NADH y un FADH_2 mediante la cadena de transporte electrónico, se generan otros **nueve enlaces fosfato** de alta energía.

El oxígeno molecular no participa directamente en el ciclo del ácido cítrico. Sin embargo, este ciclo opera únicamente bajo condiciones aeróbicas porque el NAD^+ y el FAD^+ pueden ser regenerados en la mitocondria solamente por la transferencia de electrones hasta el oxígeno molecular. Por tanto, **la glicólisis tiene ambas modalidades, aeróbica y anaeróbica, mientras que el ciclo del ácido cítrico es exclusivamente aeróbico.** La glicólisis puede tener lugar bajo condiciones anaeróbicas porque el NAD^+ se regenera durante la conversión de piruvato en lactato. Si se tiene en cuenta la reacción de la piruvato deshidrogenasa y que cada molécula de glucosa genera dos moléculas de piruvato, se puede escribir **la siguiente ecuación para el catabolismo de la glucosa a través de la glicólisis y del ciclo del ácido cítrico:**



El factor más importante que controla la actividad del ciclo del ácido cítrico es la relación mitocondrial del NAD^+ respecto a la NADH . El NAD^+ es un sustrato de tres enzimas del ciclo, así como también lo es la piruvato deshidrogenasa. En las condiciones en que disminuye la relación NAD^+/NADH (como por ejemplo en presencia de una limitación del aporte de oxígeno), la baja concentración de NAD^+ puede limitar la actividad de estas deshidrogenasas (Stryer 1995⁴⁶).

6.5 FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

Este apartado se trata de forma muy breve dado que excede el ámbito de esta tesis. La glicólisis y el ciclo del ácido cítrico generan de por sí una cantidad relativamente baja de energía en forma de ATP. Sin embargo, seis pasos de deshidrogenación (uno en la glicólisis, otro en la reacción de la piruvato deshidrogenasa y cuatro más en el ciclo del ácido cítrico) reducen en total 10 moles de NAD^+ a NADH y 2 moles de FAD^+ a FADH_2 por mol de glucosa

(Mathews 1998¹⁰⁸). La reoxidación de estos transportadores electrónicos reducidos genera la mayor parte de la energía necesaria para la síntesis de ATP.

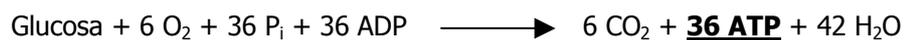
La fosforilación oxidativa es el proceso por el que se forma ATP como resultado de la transferencia de electrones desde el NADH o el FADH₂ al O₂ a través de una serie de transportadores de electrones. Este proceso tiene lugar en la membrana interna mitocondrial y genera 26 de las 30 moléculas de ATP que se forman cuando la glucosa se oxida completamente a CO₂ y H₂O (Stryer 1995⁴⁶).

6.6 RENDIMIENTO DE ATP EN LA OXIDACIÓN TOTAL DE LA GLUCOSA

Resumen del balance energético de los diferentes procesos:

<u>REACCIÓN</u>	<u>ATP</u>
1. GLICÓLISIS	
- Fosforilación de la glucosa	-1
- Fosforilación de la fructosa-6-P	-1
- Desfosforilación de 2 moléculas de 1,3 difosfoglicerato	+2
- Desfosforilación de 2 moléculas de fosfoenolpiruvato	+2
- Conversión del piruvato en acetil-CoA: se forman 2 NADH*	
2. CICLO DE KREBS (ÁCIDO CÍTRICO)	
- Formación de 2 moléculas de GTP a partir de dos moléculas de succinil-CoA	+2
- Formación de 6 NADH en la oxidación de 2 moléculas de isocitrato, 2 de α -cetoglutarato y 2 de malato	+2
- Formación de 2 FADH ₂ en la oxidación de 2 moléculas de succinato	+2
FOSFORILACIÓN OXIDATIVA	
- 2 NADH en la glicólisis. Cada uno produce 2.5 ATP	+5
- 2 NADH* en la descarboxilación oxidativa del piruvato. Cada uno produce 2.5 ATP	+5
- 2 FADH ₂ en el ciclo del ácido cítrico. Cada uno produce 1.5 ATP	+3
- 6 NADH en el ciclo del ácido cítrico. Cada uno produce 2.5 ATP	+15

BALANCE GLOBAL



6.7 CAPACIDAD OXIDATIVA DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO

Existen varias maneras de determinar la capacidad oxidativa de un músculo. Entre otras, el estudio del tipo predominante de fibras, de la expresión de las diferentes isoformas de miosina, valoración de la actividad enzimática y determinación de la densidad capilar.

6.7.1 Determinación del tipo de fibra muscular

Como hemos visto anteriormente las fibras musculares son fundamentalmente de dos tipos: fibras de contracción lenta pero resistentes a la fatiga y con metabolismo básicamente aeróbico, denominadas de tipo I; y fibras de acción más rápida y potente, pero fatigables con facilidad y de metabolismo predominantemente glicolítico o anaerobio, llamadas de tipo II. Éstas últimas a su vez, se subdividen en IIa y IIb (aunque en humanos deberíamos llamarlas IIx). El componente fundamental que determina el tipo de fibras y sus características funcionales es la proporción que tienen de las isoformas de una determinada proteína contráctil, la miosina. Las cadenas pesadas de su molécula (MyHC) son de diversos tipos, denominados I, IIa y IIx, que se corresponden de forma homónima con los tipos de fibras. Sin embargo, existen fibras mixtas (híbridas, ya mencionadas anteriormente en esta revisión) que combinan diferentes tipos de MyHC, con resultado funcional intermedio. El que se exprese una u otra miosina en un determinado músculo dependerá del grado de actividad de los genes correspondientes. Como se ha mencionado, de una forma general, los genes que codifican las formas rápidas se expresan "por defecto", mientras que los de la MyHC lenta lo hacen en respuesta a los estímulos mecánicos (Tsika 1987¹¹³). No se conoce cual es el mediador entre actividad mecánica y variación fenotípica de un músculo, aunque se especula con diferentes sustancias (Gea 1997⁴¹).

TIPO DE FIBRA	ASPECTO MACROSCÓPICO	METABOLISMO PREDOMINANTE	CONTRACCIÓN	FATIGA	MyHC PREDOMINANTE
Tipo I	Rojas	Oxidativo	Lenta	Resistente	I
Tipo IIa	Rojas	Mixto	Rápida	Resistente	IIa
Tipo IIb (ó IIx)	Blancas	Glicolítico	Rápida	Fatigable	IIx

Esquema 1. Clasificación de los diferentes tipos de fibras en los seres humanos.

En los seres humanos las fibras tipo I tienen un contenido en mitocondrias y capacidad oxidativa dos veces superior a las fibras tipo II. Esta diferencia se reduce con el entrenamiento (Lowry 1978¹¹⁴). La mayoría de las personas tienen globalmente un 50% de fibras tipo I y un 50% de fibras tipo II, aunque cada músculo posee una composición particular, determinada por su tipo de actividad. En atletas de competición de fondo el porcentaje de fibras tipo I es mayor. Por el contrario, los *sprinters* tienen más elevado el porcentaje de fibras tipo II (Gollnick 1973¹¹⁵). Estas diferencias vienen determinadas por los diferentes tipos de ejercicio como se ha visto: las fibras lentas y poco fatigables ofrecen mayor ventaja para las actividades de resistencia.

El entrenamiento determina que inicialmente se empleen las fibras rojas, de alta capacidad oxidativa. Cuando las demandas exceden la capacidad de estas fibras se reclutan también fibras blancas, con una capacidad oxidativa menor (Terjung 1976¹¹⁶). Asimismo provoca una disminución en el porcentaje de las fibras IIb en el músculo esquelético. Sin embargo el tipo de fibra que la reemplaza es variable en función de la intensidad y duración del ejercicio.

Anteriormente se ha hablado de la intensidad. Respecto a la duración, se sabe que un entrenamiento de 6-15 semanas determina un incremento significativo en las fibras tipo IIa, sin cambios en el porcentaje de las tipo I. Cuando la duración es de 8-24 semanas no se observan diferencias entre el porcentaje de las fibras tipo I y IIa. Al examinar sólo las fibras tipo I, no se observan cambios tras 5 meses de entrenamiento (Gollnick 1973¹¹⁵).

El entrenamiento aeróbico produce un incremento en el porcentaje de "formas híbridas", conteniendo a la vez isoformas de miosina, lentas y rápidas. La disminución del ATP muscular y la creatina fosfato así como la administración crónica de β_2 -adrenérgicos determina un cambio de isoformas rápidas a lentas de miosina.

A continuación se revisan algunos cambios observados en los músculos de los pacientes con EPOC. Algunos de los aspectos que se mencionan han sido también tratados en un apartado anterior.

Músculos respiratorios

El diafragma humano presenta una proporción similar de isoformas de miosina lentas y rápidas. En los pacientes con EPOC grave, y como efecto de la sobrecarga crónica, se produce una disminución de las isoformas rápidas, tanto las IIa como IIb (IIx), con un incremento de las forma lentas (Levine1997¹¹⁷, Mercadier 1998¹¹⁸). Este cambio estaría relacionado con la hiperinsuflación pulmonar y reflejaría una adaptación del diafragma.

Sánchez et al, al analizar por separado las dos porciones del diafragma (crural y costal) han observado que el porcentaje de fibras tipo I es similar en ambas, tanto en sujetos sanos como en pacientes con EPOC (Sánchez 1985¹¹⁹). Sin embargo, en individuos sanos el diámetro fibrilar es mayor en la porción costal que en la crural. Por el contrario, los pacientes con EPOC presentan un diámetro menor en la porción costal del diafragma que en la crural, con una correlación positiva con el grado de obstrucción (Sánchez 1985¹¹⁹). Esto sólo podría ser explicado por la diferente actividad mecánica de las dos porciones del diafragma, con una intensidad de contracción mayor en la porción costal en sujetos sanos. Dado que la movilidad de la caja torácica depende en gran parte de la contracción de la porción costal diafragmática, el hecho de que el diámetro de las fibras esté disminuído en los pacientes con EPOC y se correlacione con el valor del FEV₁, podría sugerir que a mayor grado de enfermedad menor participación de la porción costal en el acto ventilatorio (Sánchez 1985¹¹⁹). Por otra parte, no se observaron correlaciones entre los diámetros fibrilares en ambas porciones del diafragma y el valor de TLC. Esto podría sorprender dado que las presiones generadas por ambas porciones son dependientes del grado de hiperinsuflación. La explicación a este hecho podría ser que los pacientes incluídos en el citado estudio presentaban una enfermedad moderada con un grado muy discreto de hiperinsuflación (Sánchez 1985¹¹⁹).

Músculos "periféricos" (de las extremidades)

En estudios llevados a cabo en pacientes con EPOC grave (FEV₁ 31±9%), se ha observado que presentan, a nivel de los músculos periféricos (en concreto el *vastus lateralis*), un porcentaje de MyHC tipo I menor, con un incremento de la isoforma tipo IIa, en comparación con individuos sanos. La proporción de MyHC tipo IIx fue similar en los dos grupos. Existe además una correlación entre el FEV₁ y el porcentaje de la isoforma tipo I, con

un incremento de ésta a medida que aumenta la gravedad de la enfermedad (Maltais 1999¹⁰⁴). En otro estudio sobre el mismo músculo, en pacientes con un grado moderado de enfermedad (FEV₁ 51%), se ha descrito que el porcentaje de MyHC tipo I es similar al observado en sujetos sanos (Satta 1997¹⁰³). Esto puede ser explicado por las diferencias en el grado de actividad física existente posiblemente entre las dos poblaciones de los estudios.

Otros autores sin embargo, han descrito un incremento en la isoforma tipo IIb tanto en pacientes con enfermedad moderada-grave (FEV₁ 51%) (Satta 1997¹⁰³), como en aquellos en fases más avanzadas (FEV₁ 37±7) (Whittom 1998¹²⁰). Estos resultados son importantes, aunque no permiten diferenciar si la disfunción periférica que se ve en la EPOC se debe a un fenómeno de desacondicionamiento por inactividad o se trata de una alteración intrínseca a la enfermedad.

La causa de estos cambios en la expresión de las isoformas de miosina no están todavía claros. Distintos estudios en animales y humanos sugieren que la inactividad y el descondicionamiento podrían estar implicados. Así, en animales, la activación muscular es uno de los más potentes estímulos que regula la expresión de los genes de miosina (Goldspink 1992⁴⁴). La similitud entre los cambios que se ven en la EPOC con los que se detectan en sujetos normales con inactividad crónica, ha permitido mantener que sería la inactividad la que explicaría muchos de los cambios en los músculos periféricos de estos pacientes. Sin embargo ni la inactividad ni el desacondicionamiento subsiguiente explicarían por sí solos toda la disfunción muscular que presentan los pacientes con EPOC.

A nivel de la musculatura de extremidades superiores (deltoides) se ha encontrado un porcentaje fibrilar similar para las fibras tipo I y tipo II, con una correlación directa con los volúmenes pulmonares estáticos, similar a lo observado en el diafragma (Pastó 1998¹³). Esto podría ser debido al hecho de que se trata de un músculo localizado en la cintura escapular y como tal podría intervenir, en algunas ocasiones, como un músculo respiratorio accesorio. Esta función lo mantendría parcialmente entrenado y no se observarían los cambios inducidos por el desacondicionamiento que se han encontrado en los músculos de las extremidades inferiores (Maltais 1996¹²¹).

6.7.2 Determinación de la capacidad enzimática

El entrenamiento determina un incremento en la cantidad y capacidad metabólica de las enzimas mitocondriales. Esta adaptación juega un papel en la menor utilización de carbohidratos durante el ejercicio submáximo y por tanto determina una mayor resistencia al mismo. El incremento de enzimas oxidativos, como la citrato sintasa, incluye también la ciclooxigenasa (COX), pieza clave de la vía oxidativa al ser la enzima terminal en la cadena de transporte electrónico (Wibom 1992¹²²).

Músculos respiratorios

En estudios realizados en ratas a nivel de los músculos espiratorios (oblicuo mayor), se observó que el entrenamiento inducía un rápido incremento en la capacidad oxidativa. Sin embargo, este aumento no se acompañaba de una elevación de la proteína GLUT-4 (isoforma específica de la proteína transportadora de glucosa), a diferencia de lo que ocurría en sus músculos periféricos, en los que existía una correlación entre el nivel de esta proteína y la actividad oxidativa (Halseth 1995¹²³).

Si bien los incrementos en la actividad enzimática de los músculos espiratorios se observaron ya a las 4 semanas, el incremento en el diafragma sólo se vió a las 8 semanas. Esto puede indicar que el diafragma (activo principalmente en la ventilación) ya posee una capacidad oxidativa elevada; mientras que esa capacidad es menor basalmente en la musculatura de la prensa abdominal. Este último grupo muscular puede responder así a un estímulo de entrenamiento de más corta duración que el que se necesita para invocar una respuesta adaptativa en el diafragma. Además, el nivel de enzimas oxidativos aumentó a nivel del diafragma en su porción costal, sin cambios en la porción crural. Este resultado apoya el hecho de que la porción costal posee una mayor plasticidad metabólica que la crural; posiblemente como resultado de los diferentes requerimientos funcionales y metabólicos.

Los niveles de proteína GLUT-4 no se alteraron en ninguno de los músculos respiratorios estudiados. El hecho de que esta proteína no aumente en el diafragma después del entrenamiento, implica que el incremento en su capacidad de transportar glucosa posiblemente sea debido a un aumento en la capacidad de los transportadores de glucosa existentes para atravesar la membrana plasmática (Halseth 1995¹²³).

Los **sujetos sanos** presentan una actividad de CS y HADH (3-hidroxi-acetilcoA deshidrogenasa) mayor en el diafragma que en el dorsal ancho, al igual que ocurre con los enzimas glicolíticos, lo que nuevamente sugiere que el diafragma es un músculo ya altamente entrenado en circunstancias normales (Sánchez 1984¹²⁴). Cuando se analizó la actividad enzimática en el intercostal, sin embargo, no estaba aumentada. Esto reforzaría la idea de que este músculo es usado moderadamente en sujetos sanos y que el diafragma es el principal músculo inspiratorio (Sánchez 1988¹²⁵).

En estudios llevados a cabo en **pacientes con EPOC** se ha observado que la actividad de CS y HADH estaba aumentada en el intercostal, hallándose una correlación negativa con el FEV₁ y positiva con los volúmenes pulmonares (Sánchez 1988¹²⁵). Esto reforzaría la idea de que el músculo intercostal juega un papel importante en los pacientes con EPOC y que la enfermedad tendría un "efecto entrenamiento" sobre este músculo. En otro estudio se observó, sin embargo, que en el intercostal en los pacientes con EPOC existía una actividad glicolítica aumentada, que afectaría tanto a la parte común de la glicólisis (PFK) como a su fase anaeróbica (LDH), y sería proporcional a la gravedad de la enfermedad. Por el contrario, la actividad oxidativa parece hallarse conservada, lo que podría ser resultado de los efectos contrapuestos de diversas adaptaciones estructurales. Como se sabe, los intercostales son músculos accesorios de la inspiración, y su actuación es progresivamente más importante en situaciones en las que existe un aumento de carga (Pastó 2001¹²⁶).

Al analizar el diafragma algunos autores han observado que la actividad enzimática oxidativa en este músculo está disminuía en los pacientes con EPOC, aunque este nivel sigue siendo mayor que en el dorsal ancho (Sánchez 1984¹²⁴). La disminución en la actividad enzimática es consistente con la hipótesis de que la EPOC ejerce un efecto desentrenamiento sobre el diafragma. Aunque los pacientes estudiados no presentaban una enfermedad grave, la actividad enzimática disminuye proporcionalmente al incremento de la carga y los cambios en la configuración. Por tanto se podría asumir que la actividad enzimática sería un índice más sensible que otros a los efectos de la enfermedad sobre el músculo diafragmático.

En otros estudios, sin embargo, no se encontraron diferencias en la capacidad oxidativa diafragmática entre sujetos sanos y pacientes con EPOC (Pastó 1998¹³). Asimismo tampoco se

observaron correlaciones entre la actividad enzimática, los parámetros ventilatorios y el intercambio de gases. Esto podría reflejar más la suma de la respuesta al "entrenamiento" y de factores sistémicos deletéreos, ligados a la EPOC. Además se observó una disminución en la actividad glicolítica. Esto reflejaría la transformación de fibras que se producen en estos pacientes, con una sustitución progresiva de las fibras de tipo glicolíticas y de contracción rápida, por fibras resistentes a la fatiga y de metabolismo mixto o aeróbico (Pastó 1998¹³).

Músculos periféricos

A nivel de la musculatura periférica de las extremidades inferiores (*vastus lateralis*) se ha observado en seres humanos, que el entrenamiento de velocidad (*sprint*) no producía cambios en el potencial oxidativo. En cambio el desentrenamiento sí determinaba una disminución de la capacidad oxidativa (Linossier 1997¹²⁷).

Los pacientes con EPOC presentan a nivel del músculo periférico de las extremidades inferiores (cuádriceps) una disminución de la capacidad oxidativa en comparación con sujetos sanos. Como mecanismo implicado se ha propuesto la hipoxemia, dado que la exposición crónica a esta situación puede deteriorar la capacidad oxidativa de la célula muscular esquelética (Maltais 1996¹²¹). En contra existen otros estudios en los que el entrenamiento de una pierna en condiciones hipobáricas y de isquemia aumentaba la actividad de la CS (Holm 1972¹²⁸). Otra explicación para la reducción de la capacidad oxidativa observada en los músculos periféricos de los pacientes con EPOC, podría ser la inactividad física. La inmovilización causa una transformación de las fibras de contracción lenta a rápida, con una menor capacidad oxidativa. Así en un estudio de actividad enzimática tras un período de inmovilización de 6 semanas por cirugía de rodilla, se observó un descenso entre un 20-30% de los enzimas oxidativos (Jansson 1988¹²⁹). También la pérdida de masa muscular en pacientes con EPOC puede asociarse a una reducción en la capacidad oxidativa (Maltais 1996¹²¹).

A su vez, la actividad de la COX parece incrementada en pacientes con EPOC, especialmente en aquellos con insuficiencia respiratoria crónica. Esto parece ir en contra de otros estudios en los que se demostró una disminución de la capacidad de los enzimas oxidativos en los músculos periféricos de estos pacientes. Se podría considerar que dado que se trata de enzimas que actúan a diferentes niveles (CS en el ciclo del ácido cítrico y COX en la

cadena del transporte electrónico) su regulación también fuera diferente. Además el hecho de que esté preservada la actividad de la COX podría sugerir que ambas rutas metabólicas estuvieran "desacopladas" en los pacientes con EPOC, pudiendo ser muchos los potenciales mediadores en esta respuesta divergente (hipoxia, óxido nítrico y varias citocinas, entre ellas el TNF- α) (Saulea 1998¹³⁰).

A nivel de las extremidades superiores (deltoideas) la capacidad oxidativa es similar a la de sujetos sanos, aunque parece estar incrementada en pacientes con enfermedad más grave. Esto podría indicar un fenómeno de tipo adaptativo similar al inducido por el entrenamiento y derivado de una cierta acción del músculo como fijador de la cintura escapular y parte alta del tórax durante el esfuerzo ventilatorio (Gea 2001¹³¹).

6.7.3 Densidad capilar

La angiogénesis es el proceso por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos. Es una respuesta adaptativa al ejercicio, común en el músculo esquelético. Se cree que la angiogénesis está mediada por factores angiogénicos que determinan la proliferación y migración de células endoteliales y que la actividad angiogénica está regulada por el balance entre factores estimuladores e inhibidores. El factor angiogénico más importante es el **factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)**, seguido de otros factores como el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF-2) y el *transforming growth factor* (TGF- β_1).

Los mecanismos reguladores no están claros, aunque estudios recientes indican que la hipoxemia y/u otras alteraciones metabólicas podrían ser posibles estímulos (Gustafsson 2001¹³²). Esta teoría está avalada por numerosos estudios que muestran un incremento en la angiogénesis inducida por ejercicio cuando se reduce el flujo sanguíneo a nivel de una extremidad, tanto en animales como en humanos (Yang 1991¹³³, Sundberg 1994¹³⁴). El ejercicio en condiciones de hipoxia determina en ratas un incremento en la expresión de VEGF mRNA cuando se compara con ejercicio bajo condiciones de normoxia, sin que se observen cambios en la expresión de FGF-2 y TGF- β_1 . Esto sugeriría que la reducción local en la PaO₂ podría ser importante en la inducción de la expresión de VEGF en respuesta al ejercicio, y por tanto un importante estímulo angiogénico (Breen 1996¹³⁵). En humanos expuestos a condiciones de hipoxia marcada durante el ascenso al monte Everest se ha observado un incremento en la

densidad capilar. Sin embargo este hecho vendría determinado más por una reducción en el tamaño de las fibras musculares que por incremento capilar real (Hoppeler 1999¹³⁶).

Un argumento en contra del papel del oxígeno como principal estímulo antigénico en el músculo esquelético es el hecho de que empleando estimulación eléctrica (durante la cual no hay obviamente cambios en los niveles de oxígeno), también se produce una significativa respuesta angiogénica (Hudlicka 1990¹³⁷).

El entrenamiento induce aumentos tanto en la actividad oxidativa como en la densidad capilar. Se ha sugerido que el incremento en el consumo periférico de oxígeno y su utilización son debidos más al primer aspecto que al segundo (Blomstrand 1997¹³⁸). Sin embargo, estudios realizados en condiciones de hipoxia e hiperoxia indicarían que la capacidad de difusión del oxígeno es un factor importante en la utilización periférica de este gas. Por tanto, el incremento en el número de capilares determinaría una mayor superficie para la difusión. Asimismo el mayor potencial para extraer sustratos de la sangre puede contribuir a una mayor capacidad de ejercicio, especialmente durante largos períodos de entrenamiento. En éstos, la dependencia del sustrato a nivel muscular es un factor importante.

El aumento en el número de capilares precede al incremento en la actividad enzimática mitocondrial. Sin embargo se podría especular que el incremento en el aporte de oxígeno, mediado por una mayor vascularización, podría ser necesario y suficiente para incrementar el potencial oxidativo mediado por el ejercicio en el músculo esquelético (Skorjanc 1998¹³⁹). No obstante, parece lógico pensar que aunque se incremente la cantidad de capilares y, por ende, el aporte de oxígeno al músculo, la capacidad de los enzimas oxidativos se mantenga entonces como elemento limitante.

En los años 70 se publicaron los primeros estudios en seres humanos, que mostraron la presencia de un mayor número de capilares en el músculo esquelético en respuesta a la actividad física (Ingier 1979¹⁴⁰). Asimismo también se observó que el cese de dicha actividad inducía rápidamente una regresión en la capilaridad (Klausen 1981¹⁴¹). Sin embargo, no está establecida la intensidad y duración del ejercicio capaz de inducir cambios en la capilarización. Generalmente regímenes de entrenamiento de baja intensidad no producen cambios en la

capilaridad. Tampoco ejercicios de corta duración y alta intensidad, como el *sprint*, han demostrado una consistente adaptación en el número de capilares (Tesch 1984¹⁴²).

La variable que se usa más frecuentemente para medir la densidad capilar es el número de capilares por fibra. Con esta variable se eliminan los errores debidos a la técnica o cambios en el área fibrilar (Andersen 1977¹⁴³). Sin embargo, la densidad por área fibrilar suministra una información complementaria de gran interés dado que permite valorar el número de capilares que nutren una determinada superficie celular.

Músculos respiratorios

En estudios *post-mortem* realizados en humanos **sanos** se ha observado que el contenido capilar del diafragma es aproximadamente de 2 capilares por fibra (1.9 ± 0.1), algo mayor a lo observado en intercostales tanto externos como paraesternales (1.6 ± 0.1). Son, sin embargo, los intercostales internos los que tendrían el mayor número de capilares (2.3 ± 0.1). Esto guardaría relación más con la función de cada músculo (inspiración/expiration) que con razones anatómicas (Mizuno 1985¹⁴⁴, Mizuno 1989¹⁴⁵).

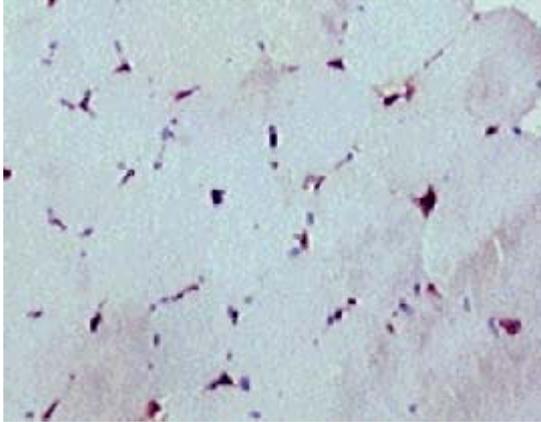
En los **pacientes con EPOC** se ha descrito un aumento en la densidad capilar tanto del diafragma (Orozco-Levi 1995⁸⁶) como a nivel de los músculos intercostales (Jiménez-Fuentes 1999⁸⁷). Estos cambios serían proporcionales al grado de alteración obstructiva y por tanto a la actividad de los músculos respiratorios. La ausencia de relación entre la densidad capilar y la PaO₂ o la desaturación con el esfuerzo indicarían, que la hipoxemia no jugaría un papel determinante en la angiogénesis en los pacientes con EPOC (Jiménez-Fuentes 1999⁸⁷).

Músculos periféricos

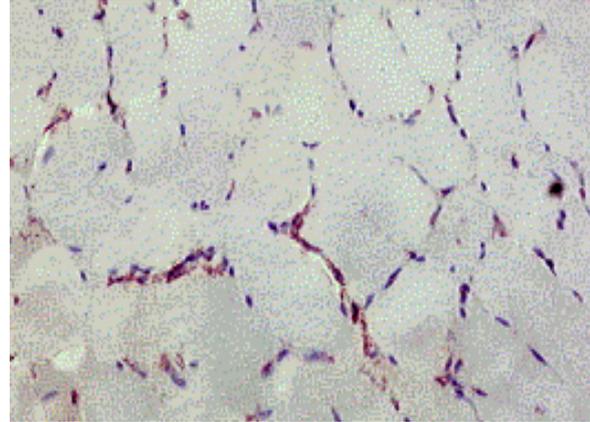
A nivel de los músculos periféricos de las extremidades inferiores, el contenido capilar en **sujetos sanos** es similar al del diafragma (1.8 ± 0.1) (Mizuno 1989¹⁴⁵). En los pacientes con **EPOC** la densidad capilar está relativamente preservada a este nivel (Whittom 1998¹⁴⁶), aunque sería posible inducir incrementos mediante el entrenamiento.

A nivel de la musculatura de extremidades superiores, se ha visto que en sujetos sanos sometidos a entrenamiento de resistencia se producía un incremento de la densidad capilar a nivel del bíceps tras 12 semanas de ejercicio (McCall 1996¹⁴⁷). Sin embargo, no existen hasta la

fecha datos sobre cual sería la densidad capilar en los músculos de las extremidades superiores en sujetos con EPOC.



a) Densidad capilar en individuo sano



b) Densidad capilar en EPOC

Figura 20. (Inmunohistoquímica empleando un anticuerpo monoclonal contra la molécula CD34. Muestra de diafragma, corte transversal. Imágenes propias).

6.8 CAMBIOS INDUCIDOS POR EL ENTRENAMIENTO EN LOS MÚSCULOS ESQUELÉTICOS

Como se ha mencionado ya, la **adaptación** se define como un cambio estable que se produce en las propiedades estructurales o funcionales de las células, tejidos u órganos después de un período de estímulo (p.e. ejercicio) repetido. Aunque el estímulo se detenga, la adaptación se mantiene durante un tiempo antes de empezar a desaparecer.

Según sus características metabólicas, la sobrecarga muscular crónica se clasifica en dos tipos: **aeróbica y anaeróbica**. La segunda se caracteriza por implicar grandes proporciones de masa muscular esquelética en ejercicios rítmicos de elevada intensidad y corta duración. El consumo de O₂ se incrementa más del doble sobre el valor de reposo. Por el contrario, la sobrecarga aeróbica (conocida también como entrenamiento de resistencia) consiste en repeticiones de ejercicios de baja frecuencia (3-10 series de 6-8 repeticiones/serie) y con cargas submáximas (65-75% o incluso menos de la contracción voluntaria máxima), intercalados con períodos más o menos prolongados de reposo (Macdonagh 1984¹⁴⁸).

El tipo de ejercicio determina el tipo de adaptación que afecta tanto a la estructura como a la función de los músculos esqueléticos.

El **entrenamiento anaeróbico** provoca hipertrofia de las células musculares con aumento de la masa muscular y la fuerza (Heilig 1983¹⁴⁹), aunque de forma relativamente lenta (0.1% por día). Es lo que ocurre en la halterofilia o el culturismo. Este tipo de entrenamiento determina un aumento en el porcentaje relativo y tamaño de las fibras de contracción rápida (Tesch 1989¹⁵⁰), disminuye el volumen mitocondrial (Luthi 1986¹⁵¹), reduce la actividad enzimática oxidativa (Tesch 1989¹⁵⁰) y no parece tener efecto importante sobre la densidad capilar, aunque puede llegar incluso a disminuirla ligeramente.

El **entrenamiento aeróbico** por el contrario, no induce hipertrofia. Determina un incremento en la capacidad del músculo para el metabolismo aeróbico con un aumento de la resistencia (Hoppeler 1986¹⁵²). Es lo que ocurre en los atletas de competición de largas distancias. Este tipo de entrenamiento disminuye el área de las fibras rápidas (Gollnick 1973¹¹⁵), aumenta la proporción de las lentas, la densidad mitocondrial y la actividad enzimática oxidativa. También incrementa la densidad y número de capilares por fibra muscular (Saltin 1983¹⁵³). Estos

hallazgos indican que las respuestas moleculares y celulares son diferentes según el tipo de entrenamiento, con diferentes patrones de expresión de proteínas tanto estructurales como enzimáticas en el músculo esquelético. En humanos, la combinación de entrenamientos aeróbico y anaeróbico determina que la fuerza desarrollada por el músculo esquelético sea menos rápida que cuando se realiza solamente entrenamiento anaeróbico (Dudley 1985¹⁵⁴, Sale 1990¹⁵⁵). Sin embargo, se obtiene un buen balance entre fuerza y resistencia.

HIPÓTESIS

7 HIPÓTESIS

Se sabe que los **músculos respiratorios** están sometidos a una sobrecarga crónica en los pacientes con EPOC, que incrementa su trabajo y modifica la mecánica de su contracción. Esto determina un deterioro funcional pero al mismo tiempo cambios adaptativos a nivel estructural. Estos cambios estructurales consisten en un menor tamaño de las fibras musculares a medida que se incrementa el grado de obstrucción, un aumento en la proporción de fibras lentas, un incremento de la densidad mitocondrial y una disminución de la longitud de las sarcómeros en relación con la gravedad de la obstrucción y el grado de atrapamiento aéreo.

Hipótesis 1

En los **músculos respiratorios** de sujetos con EPOC se observarán cambios en las diferentes estructuras implicadas en la capacidad oxidativa (entre otras, expresión diferencial de proteínas estructurales, actividad enzimática y densidad capilar). Dicha actividad se hallará **incrementada o como mínimo conservada**. Estos cambios serán proporcionales a la gravedad de la alteración funcional, pero su **intensidad será variable** dependiendo del componente analizado.

Por otro lado, está la situación de los **músculos periféricos** en la propia EPOC. Aquí la situación será totalmente distinta. Diversos trabajos sugieren que existe un desacondicionamiento o incluso una miopatía específica. En los dos casos cabría esperar alteraciones en las principales vías metabólicas, en el sentido de **disminuciones o desajustes** en las actividades enzimáticas. No obstante, recientemente se ha sugerido un fenómeno de **"compartimentalización"** de las alteraciones estructurales en los diferentes músculos de las extremidades. Es decir, que éstas estarían condicionadas por fenómenos locales dependiendo del músculo o grupo muscular analizados. Por tanto, un análisis de la actividad metabólica en músculos periféricos debe tener en cuenta el área del organismo analizada.

Hipótesis 2

Los músculos periféricos de los pacientes con EPOC mostrarán al menos dos comportamientos respecto a su actividad metabólica. Aquellos localizados en las extremidades inferiores, presentarán una menor actividad oxidativa, con cambios menores en la actividad glicolítica. No se observarán cambios relevantes en los componentes estructurales y metabólicos que participan en la actividad oxidativa de los músculos periféricos localizados en la cintura escapular, donde los efectos deletéreos sistémicos y de semi-condicionamiento (derivados de su uso como auxiliares en el esfuerzo ventilatorio), posiblemente se contrarrestarán.

OBJETIVOS

8 OBJETIVOS

8.1 OBJETIVO GENERAL

Valorar simultáneamente y con diferentes aproximaciones estructurales y metabólicas la capacidad oxidativa de los músculos respiratorios y periféricos en pacientes con EPOC.

8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar la expresión de proteínas estructurales con elevada influencia en la determinación del metabolismo fibrilar. En concreto, la expresión de las isoformas de cadenas pesadas de miosina (MyHC) en los músculos respiratorios, (en concreto, diafragma e intercostal externo) así como en los músculos esqueléticos periféricos (deltoides) en sujetos con función pulmonar normal y en pacientes con EPOC en todo su espectro de gravedad. Asimismo, establecer las relaciones existentes con la función muscular.
2. Determinar la actividad enzimática global del músculo mediante el estudio de enzimas claves de las vías oxidativa y glicolítica.
3. Analizar la actividad de enzimas fibrilares ligadas a la modalidad de contracción y metabolismo predominante (actividad ATPasa).
4. Evaluar la densidad capilar como elemento participante en la actividad oxidativa en estos mismos músculos y en ambos grupos de estudio.
5. Estudiar las relaciones entre los diferentes sistemas de evaluación de la capacidad oxidativa.

METODOLOGÍA

9 MATERIAL Y MÉTODOS

9.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio transversal, de casos y controles, en el que se realiza un análisis de la capacidad oxidativa de los músculos respiratorios y periféricos en pacientes con EPOC en todo el espectro de gravedad de la enfermedad.

El estudio fue diseñado atendiendo a los principios de la declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética de nuestra institución.

9.2 POBLACIÓN

Se incluyeron un total de 34 pacientes, procedentes de los Servicios de Neumología, Aparato Digestivo, Cirugía Torácica y Cirugía General del Hospital del Mar.

Se trataba de pacientes que eran sometidos a toracotomía o laparotomía por lesión localizada pulmonar o abdominal.

Todos ellos aceptaron de forma voluntaria la participación en el estudio y firmaron el correspondiente consentimiento informado.

A continuación se señalan los criterios de inclusión y exclusión empleados en la selección de los pacientes.

9.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Sexo masculino (para evitar interferencias con factores hormonales y de desarrollo muscular).
- EPOC: la presencia de esta entidad se definió como un $FEV_1/FVC < 70\%$ y un $FEV_1 < 80\%$ pred. Dentro de los pacientes con EPOC se estableció una subpoblación de enfermos "más graves", considerando como tales a aquellos con un $FEV_1 < 45\%$ pred. Se consideró que existía atrapamiento aéreo cuando el $RV > 120\%$ pred.
- Estabilidad clínica (más de 2 meses desde la última exacerbación), en el caso de pacientes con EPOC.
- Lesión localizada (de naturaleza neoplásica o no) pulmonar o abdominal, que requería tratamiento quirúrgico (toracotomía o laparotomía, respectivamente).

9.2.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Sexo femenino (por los motivos ya citados y basados en la prevalencia de la enfermedad en nuestro medio).
- Insuficiencia respiratoria crónica ($\text{PaO}_2 < 60$ mm Hg respirando aire ambiente).
- Hiperreactividad bronquial, definida por un incremento del FEV1 >200 ml y un 12%, después de la inhalación de 200 μgr de salbutamol.
- Presencia de enfermedades asociadas con potencial afectación muscular:
 - *Diabetes mellitus* y otras endocrinopatías (hiper/hipotiroidismo, disfunción hipofisaria, etc).
 - Nefropatías
 - Hepatopatías
 - Enolismo > 80 grs/día
 - Deformaciones de la caja torácica, afectación pleural o secuelas post-tuberculosis
 - Enfermedades neuromusculares
 - Insuficiencia cardíaca
 - Malnutrición
- Neoplasias en fase avanzada, con evidencia de enfermedad metastásica o con la coexistencia de síndrome paraneoplásico o alteración de la función hepática.
- Antecedentes de cirugía abdominal o torácica.
- Tratamiento crónico con fármacos que pueden alterar la función o estructura muscular: corticoides, antagonistas del calcio, beta-bloqueantes, anabolizantes, insulina, diuréticos, digoxina, hormonas tiroideas,

9.3 TÉCNICAS

En los pacientes incluidos se estudiaron las siguientes áreas:

- a) estado clínico y nutricional
- b) función muscular global
- c) función respiratoria y de los propios músculos respiratorios
- d) actividad oxidativa de los músculos respiratorios (diafragma e intercostal) y de extremidades superiores (deltoides).

9.3.1 Evaluación clínica y del estado nutricional

Se realizó una historia clínica completa y exploración física protocolizada en todos los pacientes.

- Evaluación del estado nutricional

Se valoró mediante parámetros biológicos y antropométricos.

- a) Parámetros biológicos

Perfil hepático y renal, hemograma, proteínas totales, albúmina, globulinas, índice albúmina/globulinas, colesterol, triglicéridos y tiempo de protombina.

- b) Parámetros antropométricos

Peso, talla, índice de masa corporal ($BMI = \text{peso}/\text{talla}^2$) e índice de masa magra ($LBM = 1.281 \times BMI^{156}$)

9.3.2 Evaluación de la función muscular global

La fuerza se evaluó mediante una dinamometría manual con un dinamómetro SS25L (Byopac System Inc. Santa Bárbara, Ca, USA). Se consideró la fuerza máxima ejercida, en tres intentos consecutivos, por la mano no dominante. Se consideraron como valores de referencia los publicados por Mathiowetz¹⁵⁷.

9.3.3 Evaluación de la función respiratoria

1. Función pulmonar

- a) Espirometría forzada

Se realizó con un espirómetro DatoSpir 92 (Sibel, Barcelona), en condiciones basales y tras la inhalación de 200 μgr de salbutamol. Se utilizaron valores de referencia para la población mediterránea (Roca 1986¹⁵⁸).

b) Volúmenes pulmonares estáticos

Se determinó el volumen de gas intratorácico (ITGV) con un pletismógrafo corporal Masterlab (Jaegger, Würzburg, Alemania), tomando también como valores de referencia los de población mediterránea (Roca 1998¹⁵⁹). Se asumió el ITGV como valor aproximado de la FRC. Tanto la capacidad pulmonar total (TLC) como el volumen residual (RV) se calcularon a partir de este valor y los obtenidos en la espirometría lenta.

c) Resistencia de la vía aérea

Se midió mediante el pletismógrafo corporal antes mencionado. A partir del valor de la resistencia se obtuvo la conductancia (Gaw) y la conductancia específica para un determinado volumen pulmonar (Sgaw).

d) Capacidad de transferencia del monóxido de carbono (DL_{CO})

Se determinó mediante el método de *respiración única* con un medidor de gases integrado con el pletismógrafo corporal, y utilizando los valores descritos para población mediterránea (Roca 1990¹⁶⁰). También se obtuvo la corrección del mencionado parámetro para el volumen alveolar (K_{CO} o índice de Krogh).

e) Gasometría arterial

Las muestras de sangre se obtuvieron, previa realización de la prueba de Allen, por punción de la arteria radial de la mano no dominante. La muestra fue procesada mediante polarografía convencional (ABL 330; Radiometer, Copenhagen, Dinamarca).

f) Patrón ventilatorio

Se determinó mediante un neumotacómetro (Screenmate; Jaeger. Würzburg, Alemania) que permitía realizar un registro continuo del volumen corriente (V_t), tiempo inspiratorio (T_I), tiempo respiratorio total (T_{TOT}) y frecuencia respiratoria (RR). El volumen minuto (V_E) se calculó a partir de V_t y RR. La señal obtenida se registró en dos sistemas digitales dependiendo del período del estudio (Labview 3.0, National Instruments, Austin, Tex, USA; y Biopack Systems Inc, Santa Bárbara, CA, USA).

9.3.4 Evaluación de los músculos respiratorios

Se evaluó la fuerza y resistencia de los músculos inspiratorios, tanto de forma global como específicamente las del diafragma.

1. Fuerza de los músculos respiratorios

a) Músculos inspiratorios de forma global

Se midió la presión máxima en boca ($PI, m_{máx}$) desde volumen residual (RV), en un esfuerzo inspiratorio máximo contra la vía aérea ocluida, utilizando un manómetro dotado de una pieza bucal obturable.

Como medida de la presión intratorácica se evaluó la presión esofágica a volumen corriente (PI, es) y la presión esofágica máxima ($PI, es_{máx}$) obtenida durante una maniobra de inhalación o "sniff" desde capacidad residual funcional (FRC). Esta medida se obtuvo mediante la colocación de un catéter con un balón distal de látex a nivel del tercio medio esofágico. El catéter estaba conectado en su porción distal a un transductor de presión Transpack-II (Abbot, Chicago, IL, USA) y este último al sistema de registro mencionado anteriormente.

b) Diafragma

Para evaluar la fuerza específica del diafragma, se calculó la presión transdiafragmática a volumen corriente (PI, di) y presión transdiafragmática máxima ($PI, di_{máx}$, obtenida durante la maniobra de inspiración nasal forzada y rápida). La PI, di se calculó como la diferencia aritmética entre la presión gástrica (PI, ga) y la esofágica (PI, es). La primera se obtuvo con la colocación de un segundo catéter con balón distal posicionado más allá del cardias (a unos 50 cm del orificio nasal).

2. Resistencia de los músculos respiratorios

El estudio de resistencia se realizó de forma global para todos los músculos respiratorios. Se llevó a cabo una prueba de Martyn modificada, que consistía en hacer respirar al paciente a través de una válvula con dos vías, una inspiratoria y otra espiratoria (Hans Rudolph, Kansas City, Kansas, USA). En el circuito inspiratorio estaba intercalada una válvula de tipo umbral unidireccional. Para que se produjera la apertura valvular y el establecimiento de flujo aéreo se requería una presión constante mínima y proporcional a la carga utilizada.

La prueba se realizaba en dos fases:

1. Fase incremental: En ésta se colocaban, en el circuito inspiratorio, cargas progresivas de 50 grs cada dos minutos hasta la claudicación del paciente. De este modo se determinó la presión máxima tolerada ($PI, th_{máx}$).

2. Fase de carga submáxima constante: En ella el paciente respiraba contra un 80% de su $PI_{th_{máx}}$ hasta la caludicación; obteniéndose el tiempo límite ($TI_{th_{80\%}}$) o "tiempo de aguante".

Durante la realización de esta prueba se registró la presión en boca a través de la colocación de un catéter conectado en el circuito inspiratorio, y a su vez con un transductor de presión y el sistema de registro antes mencionado.

Al mismo tiempo se midió el consumo máximo de oxígeno ($\dot{V}O_2$), producción de anhídrido carbónico ($\dot{V}CO_2$), cociente respiratorio (RQ) y patrón ventilatorio. Para su obtención se conectó el circuito respiratorio común a un sistema de análisis metabólico (Oxycon, versión 3.2, Jaeger, Würzburg, Alemania).

A partir de la evaluación de la fuerza y resistencia musculares se obtuvieron una serie de parámetros indicativos de la efectividad de los músculos respiratorios y su reserva frente a la fatiga:

- Reserva ventilatoria de los músculos respiratorios

Se define a partir de la relación entre la presión media y la presión máxima desarrolladas por la totalidad de los músculos respiratorios o a partir del índice tensión-tiempo de los mismos, (**TTmr**). También se calculó la reseva ventilatoria específica del diafragma (definida a partir de la relación entre la presión media y la presión máxima desarrolladas por este músculo o a partir del índice tensión-tiempo del mismo, **TTdi**). Respectivamente:

$$\overline{TTmr} = PI_{res} / PI_{es_{máx}} \times T_I / T_{TOT}$$

$$\overline{TTdi} = PI_{di} / PI_{di_{máx}} \times T_I / T_{TOT}$$

Se entiende como **reserva frente a la fatiga** el nivel en el cual no es posible mantener una carga determinada más allá de un corto espacio de tiempo sin que se produzca el fracaso muscular. Como se ha mencionado anteriormente, se considera que el dintel tiene un valor > 0.15 en individuos sanos y > 0.20 en sujetos con EPOC (Bellemare y Grasiño 1983⁸⁹).

- Efectividad de los músculos respiratorios

Se define como la presión necesaria para movilizar un V_t determinado. Se considera como la relación V_t/PI , cuando es para todos los músculos respiratorios, y la relación V_t/PI_{di} si sólo se valora el diafragma.

Además, a partir de la diferencia entre $\dot{V}O_{2m\acute{a}x}$ medido a $PI_{th_{m\acute{a}x}}$ y el $\dot{V}O_{2m\acute{a}x}$ basal se definió una nueva variable: $\dot{V}O_{2m\acute{a}xMR}$. Este valor se asume, en esta tesis, como representativo del consumo de oxígeno máximo específico de los músculos respiratorios.

9.3.5 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

El grupo de pacientes con lesión pulmonar fue intervenido según la técnica quirúrgica convencional con intubación orotraqueal selectiva. Se practicó toracotomía a través del quinto o sexto espacio intercostal ipsilateral a la lesión. La muestra diafragmática se obtuvo siempre en la porción muscular situada a 2-3 cm del ángulo costofrénico en su intersección con la línea medioaxilar.

En los pacientes con patología digestiva la vía de acceso al diafragma fue a través de laparotomía supraumbilical y se obtuvo la muestra en la porción muscular del diafragma izquierdo también a 2-3 cm del seno costofrénico. Para ello se ejercía una ligera tracción que determinaba la formación de una cúpula convexa hacia la cavidad abdominal y cóncava hacia la cavidad torácica. Se cerraba esta cúpula con puntos de sutura, lo que daba lugar a la creación de un bolsa de tabaco. De esta forma se evitaba la entrada de aire en la cavidad pleural y la consiguiente aparición de neumotórax. Posteriormente se realizaba la biopsia de esta cúpula traccionada y por último la sutura manual del músculo y la membrana peritoneal (Pastó 2000¹⁶¹).

Las muestras obtenidas se dividieron en fragmentos de aproximadamente 3 mm^3 para su procesamiento como se describirá más adelante.

La obtención de las muestras del intercostal externo se llevó a cabo en el transcurso de la toracotomía. En el momento en el que se iba a seccionar el intercostal, se cogía una porción

de músculo con una pinza de Allis, posteriormente se cortaba con unas tijeras de disección y se realizaba hemostasia con electrocoagulación.

En el caso del deltoides se procedía a incisión del plano cutáneo, disección del tejido subcutáneo hasta visualizar el músculo. A continuación se llevaba a cabo el mismo procedimiento que el descrito para el intercostal. Finalmente se practicaba la hemostasia con electrocoagulación o con punto de sutura y cierre del plano cutáneo con seda quirúrgica.

El tamaño de las muestras obtenidas oscilaba, en todos los casos, entre 0.5 y 1 cm de longitud.

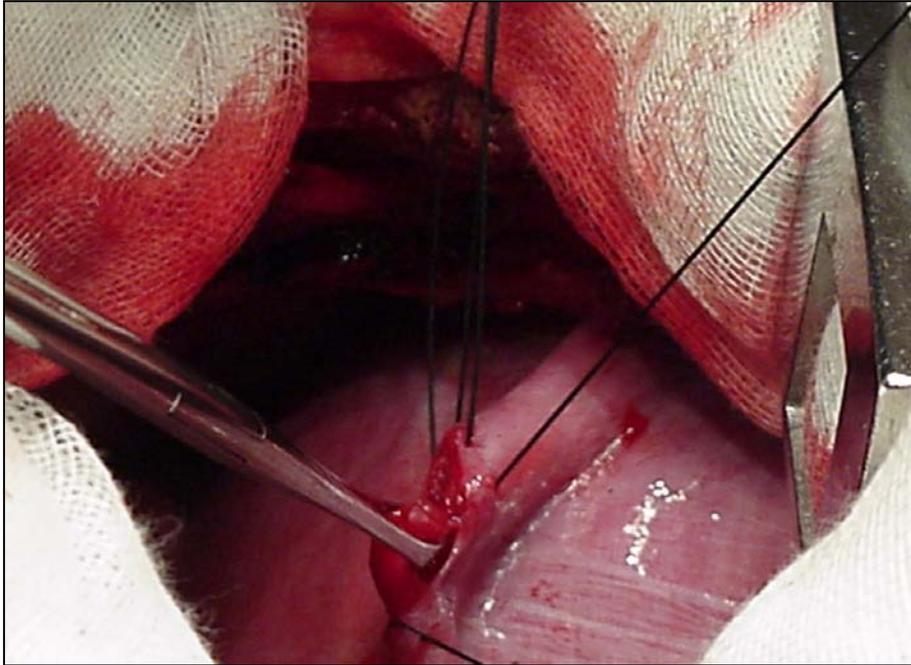


Figura 21. Toma de biopsia diafragmática por toracotomía

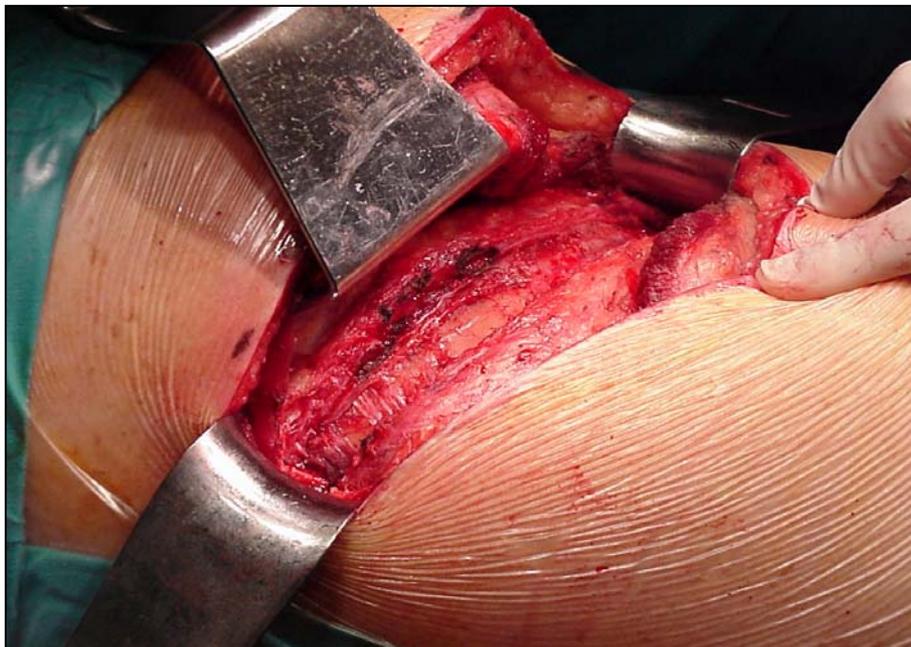


Figura 22. Toma de biopsia de intercostal por toracotomía

9.3.6 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El procesamiento y análisis de las muestras se llevó a cabo conjuntamente en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital del Mar y en el Laboratorio de Biología Celular, del grupo de Neumología (Unidad de Investigación Respiratoria y Ambiental, IMIM).

Las muestras se procesaron todas de la misma manera.

1. Distribución y congelación

Una vez obtenida la biopsia muscular, según el procedimiento descrito en el apartado anterior de este capítulo, se procesó de la siguiente forma:

- a) El primer fragmento muscular se preservó en formaldehído al 10% y posteriormente se incluyó en parafina. Los cortes de tejido se realizaron con un microtomo (Leica RM 2035, Nussloch, Alemania) en secciones de 5 micras, siempre con las fibras musculares orientadas perpendicularmente al plano de corte. Posteriormente los cortes consecutivos se fijaron a un portaobjetos y se utilizaron para realizar los estudios de microscopía óptica convencional e inmunohistoquímica (tipificación de fibras y evaluación de la densidad capilar).
- b) el segundo fragmento se colocó sobre una pequeña porción de papel de filtro que servía de soporte y después de la orientación en sentido transversal de sus fibras se procedió a la congelación de la misma, previa cobertura con un gel de congelación (Ornitol-Carbamiltransferasa, OCT). La muestra se introdujo en una solución de isopentano enfriado en nitrógeno líquido durante unos 60-70 segundos y posteriormente en el propio nitrógeno líquido. Finalmente las muestras se almacenaron a -80° hasta el momento de su utilización. Esta muestra se utilizó para la determinación de las proporciones fibrilares con técnicas enzimáticas (ATPasa).
- c) el tercer fragmento muscular se colocó en un criovial y se congeló directamente en un termo con nitrógeno líquido. Una vez realizada esta técnica se transportó a un congelador donde se almacenó a -80°C hasta el momento de su procesamiento. Esta muestra es la que posteriormente se utilizó para las determinaciones enzimáticas.

2. Muestra incluida en parafina

a) Obtención de los cortes histológicos (parafina)

Al tejido incluido en parafina, se le realizó un primer corte histológico para determinar la orientación de las fibras musculares en tinción convencional de hematoxilina-eosina. La orientación correcta de los cortes de la biopsia muscular realizados en el microcriotomo, es transversal y perpendicular al plano de corte.

Una vez que la muestra estuvo correctamente orientada, se realizaron cortes histológicos consecutivos utilizando el microtomo antes citado. Los cortes de tejido fueron tratados previamente con APES (3 aminopropiltriethoxilano 99%) (Sigma-Aldrich, Madrid) para aumentar la adhesión del tejido, y se colocaron sobre un portaobjetos para ser almacenados a 4°C.

b) Desparafinación de las muestras y amplificación de la expresión antigénica del tejido

Para desparafinar las muestras se realizó el siguiente protocolo:

- Se colocó el tejido en una estufa entre 70-75°C durante media hora para licuar la parafina.
- Se introdujeron los portaobjetos en tres baños consecutivos de xilol (Prolabo, MERCKeurolab, París, Francia) con una duración de 20 minutos cada uno.
- Posteriormente se rehidrató el tejido, haciéndolo pasar por diferentes baños de alcohol en concentraciones decrecientes (100, 100, 96, 96 y 70°) (MERCK, Merck KgaA, Darmstadt, Alemania), cinco minutos en cada uno de ellos.
- Finalmente se dejó el tejido como mínimo 5 minutos en PBS (solución *buffer* fosfato-salino, pH 7.4) antes de procesarlo con la solución de citrato de sodio.

Para obtener una mejor expresión antigénica del tejido en la técnica de inmunohistoquímica que se analizará a continuación, se colocó la muestra de tejido, una vez desparafinado y rehidratado, en una solución de PBS + ácido cítrico 0.21% (Sigma Chemical, USA, Sigma; Aldrich Chemie GmbH, Munich, Alemania) en una olla de presión durante un segundo. Una vez finalizado este proceso se dejó el tejido toda la noche a 4°C en solución reciente de PBS.

c) Técnica de Inmunohistoquímica: tipificación por MyHC y densidad capilar

La tipificación de las fibras musculares se realizó utilizando una técnica de marcaje inmunohistoquímico. De los dos cortes consecutivos de tejido que se colocaron en cada

portaobjeto, uno se incubó con anticuerpo monoclonal frente a la isoforma de MyCH I (clon MyHCs. Monoclonal antibody, Myosin Heavy Chain Type I. Biogenesis, Poole, Inglaterra) y el otro con anticuerpo monoclonal frente a la isoforma de MyCH II (clon MyHCf. Monoclonal antibody, Myosin Heavy Chain Type II. Biogenesis, Poole, Inglaterra), como se describe a continuación. Las fibras se clasificaron en tipo I, II e híbridas. Las fibras híbridas son aquellas que presentan inmunotinción para ambos tipos de anticuerpos empleados.

La técnica de inmunohistoquímica se realizó de la siguiente forma:

c.1) Tipificación de MyCH

- El tejido, que estuvo toda la noche en PBS, fue lavado con PBS durante 5 minutos. Se colocó entonces el primer anticuerpo, anti-MyHC I ó anti-MyHC II según correspondía a cada corte, diluído en PBS+BSA (suero albúmina bovina) al 1%, dilución de trabajo 1:50, y se incubó en cámara húmeda a 37°C durante 60 minutos. Estos anticuerpos monoclonales son específicos para detectar las isoformas de miosina de cadenas pesadas, tipo I ó tipo II, del músculo esquelético humano (MyHC). No existen anticuerpos actualmente que permitan la diferenciación entre MyHC-IIa y MyHC-IIx.
- Finalizada la incubación se realizaron tres lavados con PBS durante 5 minutos cada uno.
- A continuación se colocó sobre los dos cortes consecutivos de tejido el segundo anticuerpo, anti IgG de ratón conjugado con biotina (Universal Secondary antibody Biotin, ref AB6000, The Binding Site, Birmingham, Inglaterra), diluído en PBS+BSA al 1%, dilución de trabajo 1:15 y se incubó durante 30 minutos a 37° en cámara húmeda. Finalizada la incubación se lavó tres veces con PBS durante 5 minutos cada uno.
- El siguiente paso consistió en incubar los dos cortes consecutivos del tejido en H₂O₂ al 6% durante 15 minutos, para inactivar la peroxidasa endógena del mismo y posteriormente se lavaron tres veces con PBS.
- A continuación los cortes se incubaron en avidina-peroxidasa (ref IC019, The Binding Site, Birmingham, Inglaterra), dilución de trabajo 1:20, durante 30 minutos a 37° C. Al finalizar la incubación se realizaron 3 lavados con PBS en iguales condiciones a las anteriores.
- El revelado de la reacción se realizó utilizando el sustrato de la peroxidasa H₂O₂ y como sistema cromogénico el DAB (3-3 diaminobenzidina). Fueron necesarios entre 5 a 10

minutos para que las células marcadas positivizaran a color marrón. La reacción enzimática se detuvo con agua destilada durante 5 minutos.

- Por último se contrastó el tejido en hematoxilina de Mayer (20 segundos), y posteriormente se eliminó el colorante con abundante agua corriente.
- Para analizar los cortes histológicos se deshidrató el tejido en alcoholes (70, 96, 96, 100, 100°), durante 3 minutos cada uno; finalizando con dos baños con xilol también de 3 minutos cada uno. Las muestras se montaron en el medio de montaje DPX (Panreac Química, Barcelona).

c.2) Estudio de la densidad capilar (Técnica de inmunohistoquímica sistema Envisión)

El CD34 es una molécula "*cluster designation*" (CD) que se expresa en el endotelio capilar humano y no en las células musculares. Se empleó un anticuerpo monoclonal anti CD34 para marcar los capilares que irrigan cada fibra muscular.

Una vez realizada la desparafinación e hidratación del tejido se procedió a la recuperación antigénica mediante calor. Para el CD34 esta recuperación se realiza con microondas a potencia de 250 w durante media hora en tampón EDTA 1 mM y a pH 8. El Ac primario es anti-endotelial células CD34, clona QBEND/10 (Biomedica Corp, Foster City, CA, USA) que se incubó durante media hora a 37°C. Posteriormente se procedió a inactivar la peroxidasa endógena mediante H₂O₂ al 6%. A continuación se realizó la unión del Ac secundario mediante el sistema EnVision que consiste en un polímero de dextrano de alto peso molecular conjugado al Ac secundario y a la enzima peroxidasa. Este sistema incrementa la sensibilidad de la técnica, dado que la reacción es sólo de dos pasos y se elimina el problema de la biotina endógena. El sistema de revelado se realiza con un sustrato (peróxido de hidrógeno) y un cromógeno (3-3 diamino benzidina, DAB). Se procede posteriormente a tinción de contraste con hematoxilina, deshidratación con gradiente creciente de alcoholes hasta xilol y montaje permanente de las preparaciones con el medio de montaje DPX (Panreac Química, Barcelona) para su posterior análisis. Toda esta técnica se realizó de forma automatizada mediante el aparato TechMate 500 (DAKO, Glostrup, Dinamarca).

d) Análisis de las muestras de tejido muscular

Los cortes histológicos se analizaron mediante un microscopio óptico (OLYMPUS, series Bx 50F3, Olympus optical Co, Tokio, Japón) y las imágenes fueron digitalizadas empleando el *software* PIXERA (VISUAL COMMUNICATION SYSTEM, Pixera studio 1.2, Pixera Corporation, Los Gatos, CA, USA). Con la utilización de un programa de morfometría digital (NIH image, Version 1.60, USA) las imágenes digitalizadas fueron medidas y se determinaron los valores de porcentaje de cada tipo fibrilar y tamaño. Se contabilizaron y midieron un mínimo de 100 fibras por muestra muscular.

Se utilizó la medida del diámetro mínimo fibrilar para determinar el tamaño de las fibras musculares, ya que este parámetro es el menos alterado por cambios accidentales en el plano de corte.

En el caso de los cortes de fibras musculares teñidas con el anticuerpo anti-CD34 se contaron, por microscopía óptica, el número de capilares que irrigaban cada fibra muscular. También se contabilizó un mínimo de 100 fibras en cada caso.

3. Muestra incluida en OCT

a. Histoquímica enzimática: Técnica de ATPasa

a.1. Corte

Se obtuvieron cortes de 6 μm de espesor mediante un criotomo Cry-cut (Reichert-Jung, Nusslock, Alemania) a una temperatura de -20°C . Posteriormente eran lavados con alcohol de 70°C , recubiertos de una sustancia adhesiva de gelatina (Gelatina Alumbre Cr) y adheridos a un portaobjetos (76x26, Resy, Alemania). De este modo la pieza queda fuertemente adherida y preparada para su tinción.

a.2 Técnica de ATPasa

Tras el corte y fijación en los portaobjetos, se procedió a su incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos en una solución compuesta por 2 cc de veronal sódico 0.1 M (Merck Schuchardt, Munich, Alemania), 2 cc de cloruro cálcico 0.18 M (Merck Schuchardt, Munich, Alemania) y 6 cc de agua destilada (Grifols, Barcelona). Esta solución fue ajustada a diferentes niveles de pH para las diferentes determinaciones de la técnica (pH 9.4, pH 4.6, pH 4.2). Posteriormente las muestras fueron incubadas durante 45 minutos en una solución de sal

sódica de ATP (25 mg; Sigma, S Louis, MO, USA), cloruro cálcico (1 cc, 0.18 M), veronal sódico (2 cc, 0.1 M) y agua destilada (6 cc). Dicha solución también se ajustaba a los diferentes niveles de pH utilizados. El siguiente paso consistió en someter las muestras a diferentes lavados: primero, en cloruro cálcico al 1% (Merck, Schuchardt, Munich, Alemania) durante 10 minutos; en segundo lugar, en una solución de cloruro de cobalto (Merck, Schuchardt, Munich, Alemania) durante tres minutos; luego en veronal sódico 0.01 M; posteriormente en agua destilada y por último en sulfuro amónico (Panreac, Barcelona) durante 20-30 segundos, y agua destilada. Finalmente se procedió a la deshidratación de las muestras en alcoholes de graduación progresivamente superior (96°, 99°, 100°) y a un baño final en xilol (Panreac, Barcelona). Con este proceso se obtenía una coloración diferente para cada tipo de fibra según el pH utilizado. Con el pH de 4.6 se pueden diferenciar los tres tipos de fibras: gris oscuro para las de tipo I, gris tenue para las de tipo IIa y gris intermedio para las fibras de tipo IIb. Con el pH de 9.4 las fibras de tipo I se ven de color gris tenue y las de tipo II gris oscuro. A pH 4.3 las fibras de tipo I se ven de color gris oscuro y las tipo II gris tenue.

b. Análisis de la muestra

Se realizó de forma similar a la ya expuesta para la muestra de parafina.

4. Muestra preparada en criovial

a. Preparación del homogeneizado celular

En primer lugar se determinó el peso mínimo de músculo necesario para realizar las determinaciones enzimáticas que fue de 15-20 mg. Posteriormente se homogeneizó manualmente el tejido criopreservado macerando el músculo con un pequeño mortero sobre nitrógeno líquido y después se repartió en tubos tipo Eppendorfs.

b. Determinación de la actividad de las principales enzimas musculares

A continuación se añadió el tampón de homogeneización de enzimas formado por: 605.5 mg de Tris-HCL 50 mM, 148.9 mg de ácido etilendiaminotetracético, EDTA 4 mM, 282.4 mg de fluoruro potásico 30 mM y 209 µl de 2 β-mercaptoetanol, 30 Mm. Se ajustó el pH a 7.0, haciendo una dilución total de la muestra a 1/20 (20 µl por cada mg). Se homogenizó con la punta de teflón (en gel), cinco o seis veces, durante pocos segundos y a baja velocidad, y se vigiló que no quedasen restos de tejido en la punta ni en las paredes del tubo. Se centrifugó a

100 x g durante 20 minutos y se separó una alícuota homogénea del sobrenadante de unos 100 µl, para hacer la extracción para la citrato sintasa (CS). En el mismo tubo se realizó una nueva centrifugación a 6800 x g durante 20 minutos y se separaron 100 µl del sobrenadante para determinación de fosfofructokinasa (PFK), lactato dehidrogenasa (LDH) y creatin fosfoquinasa (CPK).

b.1) *Determinación de la Citrato Sintasa*

La alícuota se diluyó hasta 1/40. En la cámara fría se añadió a cada tubo la cantidad de tritón necesaria para tener una concentración final de 0.5% (10 µl de tritón en 200 µl de muestra 1/40). Se agitó el homogenizado con agitadores magnéticos dentro de cada tubo durante unos 20 minutos. Se cogió una alícuota de 100 µl, realizándose una dilución de 1/40. A continuación se colocó en baño a 25° C y se realizaron dos determinaciones siempre (como máximo a los 5 y 10 minutos).

Cabe recordar que la CS participa en la siguiente reacción:



Los reactivos se prepararon de la siguiente forma:

- Tampón Trietanolamina (0.7 M): 1.04 g/10 ml (pH 8.5 con HCl), siendo su volumen cúbico de 420 µl y su concentración final 0.58 mM.
- L-Malato (140 mM): 375 mg/20 ml (pH 7.5 con KOH), siendo su volumen cúbico de 20 µl y su concentración final 5.6 mM.
- NAD (10mM): 3.3 mg/500 µl, siendo su volumen cúbico de 10 µl y su concentración final 0.2 mM.
- MDH (600 U/ml): se centrifugaron 50 µl de la misma durante 15 minutos a 135000 rpm y se resuspendió el sobrenadante, siendo su volumen cúbico de 20 µl y su concentración final 24 U/ml.
- Acetil-CoA (8.4 mM): 0.5 mg/75 µl, siendo su volumen cúbico de 20 µl y su concentración final de 34 µM.
- La muestra: se utilizó un volumen cúbico de 10 µl de la misma.

Se colocaron los reactivos por este orden hasta la MDH y se esperó la estabilización de la absorbancia (unos dos minutos). Se añadió entonces la muestra y también se esperó la estabilización (oxidación específica) (otros dos minutos). Finalmente se disparó la reacción con el Acetil-CoA y se leyó inmediatamente el incremento de la absorbancia cada minuto durante cuatro minutos, mediante espectrofotometría, observando si este incremento era constante. El cálculo implicó determinar los valores de la absorbancia al inicio (A1) y al término de los cuatro minutos (A2). El volumen total de la cubeta fue de 500 μ l y se realizó la técnica a una temperatura de 25° C, con una longitud de onda de 340 nm (Srere 1969¹⁶², Zammit 1976¹⁶³, Tesch 1989¹⁶⁴). El cálculo de la variable final de actividad enzimática se realizó a partir de las siguientes fórmulas:

$$\text{Abs/min} = (A2 - (A1^3/A2))/4$$

$$U/L = \text{Abs/min} \times 7936.5$$

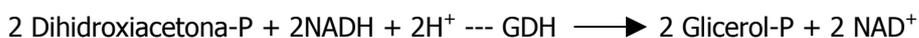
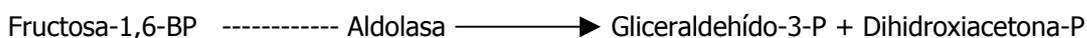
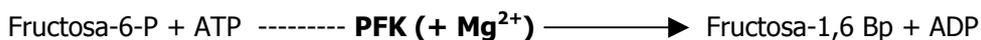
$$U/g \text{ tj} = \text{Abs/min} \times 317.46$$

$$U/g \text{ prot} = (U/L)/(\mu\text{g prot}/\mu\text{l})$$

b.2) *Determinación de la Fosfofructoquinasa*

Una vez realizada la segunda centrifugación se cogieron 100 μ l, previa dilución (1/40) con el tampón de enzimas. Se pusieron inmediatamente en un baño a 25°C y se realizaron dos determinaciones en diferentes tiempos (a los 10 y 25 minutos).

Cabe recordar que la PFK participa en la siguiente reacción:



Los reactivos se prepararon de la siguiente forma:

- Tampón: 242,2 mg de TRIS-HCL (200 mM) a una concentración final 50 mM, 3,7 mg de EDTA (1 mM) a una concentración final 6 mM, 48,8 mg de MgCL₂ (24 mM) a una concentración final 6 mM, 21,1 mg de SO₄(NH₄)₂ (16 mM) a una concentración final 4 mM. El tampón se enrasó a 10 ml y se ajustó a un pH de 8. El volumen cúbico final fue de 250 μ l.

- Fructosa-6-P (10 mM): 3mg/ml siendo su volumen cúbico de 100 μ l y su concentración final 0,2 mM.
- NAD (10 mM): 0,7 mg/0.5 ml (x2), siendo su volumen cúbico de 100 μ l y su concentración final 0,2 mM.
- Enzimas: se mezclaron 40 μ l de aldolasa (20 mg/2 ml) con 10 μ l de GDH (Gliceraldehído 3P deshidrogenasa/TPI (Triosa P isomerasa). Esta mezcla se diluyó dos veces con el tampón, es decir se añadieron 450 μ l a los 50 μ l de enzimas. Las concentraciones finales fueron de 0,36 U/ml para la aldolasa y 6,2 U/ml/74,5 U/ml para la GDH/TPI. Se emplearon 390 μ l de H₂O y 10 μ l de muestra. El ATP-Mg se reconstituyó con 6,05 mg/ml, siendo su volumen cúbico de 100 μ l y su concentración final 1 mM.

Se colocaron los reactivos por este orden en la cubeta. Se añadió la muestra y se dejó incubar unos 5 minutos a 25°C. Se disparó la reacción con el APT y se midió la disminución de la absorbancia a 340 nm cada minuto durante 4 minutos, mediante espectrofotometría. Se calculó la disminución de la absorbancia/min dividiendo la disminución total por los 4 minutos.

Los cálculos se realizaron empleando las siguientes fórmulas:

$$U/L = \text{Abs/min} \times 7936.5$$

$$U/g \text{ tj} = \text{Abs/min} \times 317.46$$

$$U/g \text{ prot} = (U/L) / (\mu\text{g prot}/\mu\text{l})$$

b.3) *Determinación de la Lactatodeshidrogenasa*

La determinación de LDH se basó en la disminución de la concentración de NADH. La tasa de decrecimiento de la concentración de NADH se determinó fotométricamente y fue directamente proporcional a la actividad de la LDH presente en la muestra.

La LDH participa en la siguiente reacción:



Se emplearon 10 μ l de muestra a los que se añadieron 500 μ m de reactivo (Kit comercial Merkotest, 3399 LDH, Merck). La temperatura de trabajo fue de 25°C y la longitud de onda espectrofotométrica de 340 nm.

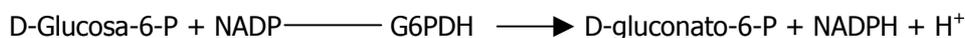
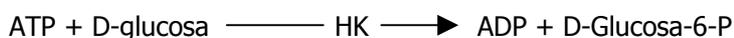
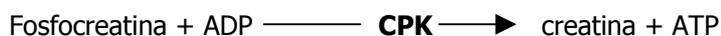
La actividad enzimática se determinó como incremento de la absorbancia cada minuto durante 4 minutos y se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$U/L = \text{Abs}/\text{min} \times 8095$$

b.4) *Determinación de la Creatínfosfoquinasa*

La determinación de la CPK se basó en el incremento de la cantidad de NADPH. La tasa de crecimiento de la concentración de NADPH se determinó fotométricamente y es directamente proporcional a la actividad de la CPK presente en la muestra.

Cabe recordar que la CPK participa en la siguiente reacción:



Se emplearon 20 μl de muestra a los que se añadieron 500 μl de reactivo (Kit comercial Merck-1-test, 12134 CK _(NAC-activado)). La temperatura de trabajo fue de 25°C y la longitud de onda empleada en la medición espectrofotométrica de 340 nm.

La actividad enzimática se determinó como incremento de la absorbancia cada minuto durante 4 minutos y se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$U/L = \text{Abs}/\text{min} \times 4127$$

RESULTADOS

10 RESULTADOS

10.1 DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA EN SU TOTALIDAD

10.1.1 Características clínicas y nutricionales

Se han estudiado un total de 34 pacientes de sexo masculino sometidos a toracotomía (por patología pulmonar localizada, neoplásica o no) o cirugía abdominal (por patología digestiva localizada, benigna o maligna). Todos los pacientes presentaban un correcto estado general, avalado por la historia clínica, exploración física y pruebas complementarias.

La edad media de los pacientes fue de 59 años. Las variables generales, antropométricas y nutricionales más destacadas se muestran en la tabla 1.

10.1.2 Función pulmonar

Los valores funcionales, tanto de volúmenes pulmonares dinámicos como estáticos e intercambio de gases, se muestran en la tabla 2. Los valores medios fueron de $68 \pm 27\%$ ref para el FEV₁, $75 \pm 19\%$ ref para la FVC y $64 \pm 13\%$ para el cociente espirométrico. Los volúmenes estáticos se determinaron en todos los pacientes excepto en uno de ellos, y los valores medios fueron: $106 \pm 15\%$ ref para la TLC y $140 \pm 52\%$ ref para el RV. La resistencia de la vía aérea, expresada como conductancia específica, mostró un valor de $73 \pm 38\%$ ref. En cuanto al intercambio de gases, en dos de los sujetos no se pudo determinar la transferencia del monóxido de carbono. Su valor medio fue de $83 \pm 21\%$ ref para la DLco y $85 \pm 17\%$ ref para la Kco. Además, ningún paciente se encontraba en situación de insuficiencia respiratoria (PaO₂ 86 ± 11 mm Hg), aunque algunos de los enfermos con EPOC más grave presentaban una hipoxemia ligera o moderada sin hipercapnia en casi la totalidad de ellos.

10.1.3 Función muscular, periférica y respiratoria

a) Fuerza de los músculos periféricos

La evaluación de la fuerza de los músculos periféricos se llevó a cabo mediante dinamometría manual. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 3. Los valores medios fueron de 36 ± 8 dinas para la mano dominante, 30 ± 8 para la no dominante ($78 \pm 22\%$ ref). Por tanto, la fuerza se hallaba ligeramente disminuída.

b) *Fuerza y reserva funcional de los músculos respiratorios*

En la tabla 4 se muestran las presiones generadas por los músculos respiratorios a volumen corriente y en situación de reposo. El valor medio de la $PI_{es_{pic}}$ (expresión indirecta de la "compliance") fue de -7.5 ± 3.0 cm H₂O y la transdiafragmática de 14.2 ± 5.2 cm H₂O. En cuanto a las presiones medias los valores fueron de -5.8 ± 2.8 y 10.7 ± 4.2 cm H₂O, respectivamente.

En la tabla 5 está registrada la fuerza máxima generada por los músculos inspiratorios obtenida a diferentes niveles (boca, esófago y estómago). El valor medio de la $PI_{m_{máx}}$ obtenida durante la maniobra estática de Müller, fue de -82 ± 40 cm H₂O ($71 \pm 19\%$ ref). Por tanto, también ligeramente disminuída. El valor medio de la presión esofágica, obtenida durante la maniobra máxima (*sniff*) fue de -75.3 ± 20.7 cm H₂O, la presión gástrica de 26.7 ± 19.1 cm H₂O y la transdiafragmática de 102.7 ± 29.6 cm H₂O.

En la tabla 6 se muestra la reserva funcional de los músculos respiratorios, obtenida a partir del análisis conjunto de presiones y de las variables del patrón ventilatorio. El valor medio del TT_{mr} fue de 0.03 ± 0.02 y el del TT_{di} fue de 0.04 ± 0.02 . Por tanto, muy alejados de los umbrales de fatiga.

c) *Resistencia de los músculos respiratorios*

En la tabla 7 se hace constar la variable de presión máxima sostenible (PMT) conseguida en boca durante la realización de la prueba de esfuerzo incremental específica para los músculos respiratorios (prueba de Martyn). Los valores medios de PMT obtenidos fueron de -61 ± 23 cm H₂O. El valor medio del T_{lím} (tiempo de aguante en la prueba submáxima) fue de 12 ± 5 min (valor que puede considerarse dentro de los límites de la normalidad).

10.1.4 Patrón ventilatorio basal

El patrón ventilatorio se determinó en situación basal, y posteriormente durante el esfuerzo máximo en cicloergómetro (tabla 8a). Los valores obtenidos en situación de reposo fueron: V_t 683 ± 162 ml, RR 16 ± 4 min⁻¹, T_I 1.6 ± 0.8 seg y T_I/T_{TOT} 0.4 ± 0.1 .

10.1.5 Prueba ergométrica incremental

Se realizó en sólo 18 sujetos (11 pacientes con EPOC). En la tabla 8b se muestran los parámetros ventilatorios, metabólicos y de carga. El patrón ventilatorio al final de la prueba ergométrica mostró un V_t de 1565 ± 559 ml y un RR de 33 ± 8 min⁻¹. Al analizar las variables

metabólicas, éstas mostraron unos valores medios de 23 ± 8 ml/kg/min para el $\dot{V}O_2$ ($65 \pm 19\%$ ref) y 1.1 ± 0.1 para el RQ. La carga máxima tolerada ($\dot{W}R$) fue de 113 ± 49 watts ($66 \pm 21\%$ ref). Por tanto, la tolerancia al esfuerzo se hallaba moderadamente reducida.

10.1.6 Análisis estructural de los músculos respiratorios y periféricos

a) Estructura del DIAFRAGMA

Como se ha mencionado en el apartado de metodología, en todos los casos se evaluó un mínimo de 100 fibras para la determinación de cada uno de los valores estudiados. Mediante la técnica de inmunohistoquímica se determinaron el tamaño y el porcentaje de cada tipo de fibras. Los resultados obtenidos fueron: fibras de tipo I, $52 \pm 10\%$ con un diámetro mínimo (D_{min}) de 42.3 ± 5 μm (valores normales, entre 40 y 60 μm); fibras de tipo II, $48 \pm 10\%$ y diámetro mínimo de 46.1 ± 10 μm . El diámetro global fue de 44 ± 6.3 μm . Estos valores se muestran en la tabla 9.

b) Estructura del INTERCOSTAL EXTERNO

Los resultados obtenidos fueron (tabla 10): % de fibras tipo I, 55 ± 17 y diámetro mínimo (D_{min}), 44.3 ± 9 μm ; % de fibras tipo II, 45 ± 17 y diámetro mínimo 43.2 ± 9 μm . El diámetro global fue de 42.5 ± 9.4 μm .

c) Estructura del DELTOIDES

Los resultados obtenidos fueron: % de fibras tipo I, 39 ± 10 ; diámetro mínimo (D_{min}), 50.3 ± 10.6 μm ; % de fibras tipo II, 61 ± 10 ; diámetro mínimo 52.1 ± 9.8 μm . El diámetro global fue de 52.2 ± 10.1 . Estos valores se muestran en la tabla 11.

Por tanto, las fibras predominantes eran las oxidativas en los músculos respiratorios y las glicolíticas en el periférico. El tamaño se hallaba preservado en todos los músculos.

10.1.7 Actividad enzimática

La actividad enzimática se determinó a dos niveles: la actividad enzimática fibrilar, mediante la técnica de ATPasa, que permitió dividir las fibras en tres grupos (I, IIa y IIx), y la actividad enzimática muscular global, mediante la cuantificación de los niveles de CS (como enzima clave de la vía oxidativa), CPK, LDH y PFK.

a) Actividad ATPasa (tablas 12a, 13a y 14a)

Diafragma: Los resultados fueron: $53\pm 10\%$ de fibras de tipo I, $36\pm 10\%$ de fibras de tipo IIa y $11\pm 7\%$ de fibras de tipo IIx.

Intercostal: $48\pm 10\%$ de fibras de tipo I, $31\pm 12\%$ de fibras de tipo IIa y $22\pm 12\%$ de fibras de tipo IIx.

Deltoides: $50\pm 7\%$ de fibras de tipo I, $33\pm 4\%$ de fibras de tipo IIa y $17\pm 3\%$ de fibras de tipo IIx.

b) Actividad enzimática global

Los resultados correspondientes a los tres músculos se exponen en las tablas 12b, 13b y 14b.

b.1 Enzimas oxidativos

Se determinó la actividad de la Citrato Sintasa en los tres músculos estudiados y se expresó su valor en $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$.

Diafragma: CS 102 ± 37 $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. Intercostal: CS 86 ± 29 $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. Deltoides: CS 57 ± 28 $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$.

b.2 Enzimas no oxidativos

Se analizó la actividad de tres enzimas no oxidativas: CPK, LDH y PFK. Los resultados obtenidos variaban según el grupo muscular estudiado. Todas las unidades se expresaron, como en el caso anterior, en $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$.

Diafragma: CPK 1429 ± 682 , LDH 208 ± 66 y PFK 87 ± 66 $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. Intercostal: CPK 3552 ± 1609 , LDH 271 ± 68 y PFK 63 ± 28 $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. Deltoides: CPK 1431 ± 711 , LDH 229 ± 71 y PFK 57 ± 53 $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$.

Por tanto, persistía el predominio ligero de la actividad oxidativa en el diafragma, y ésta se hallaba balanceada en el intercostal y el músculo periférico.

10.1.8 Densidad capilar

Para la determinación de la densidad capilar se contabilizaron siempre los capilares correspondientes a un total de 100 fibras. Conjuntamente con la medición del área fibrilar se

establecieron las siguientes variables: capilares por fibra (caps/fibra), fibras por capilar (fibras/cap), superficie fibrilar por capilar ($\mu\text{m}^2/\text{cap}$) y número de capilares por unidad de área fibrilar (caps/ μm^2).

Los resultados correspondientes a cada uno de los músculos se muestran en las tablas 15, 16 y 17. Así:

Diafragma: capilares/fibra 2.7 ± 1.1 y superficie fibrilar/capilar $664.4 \pm 390.2 \mu\text{m}^2$. Intercostal: capilares/fibra 2.8 ± 0.6 y superficie fibrilar/capilar $585.1 \pm 181.1 \mu\text{m}^2$. Deltoides: capilares/fibra 2.4 ± 0.5 y superficie fibrilar/capilar $844.6 \pm 231.3 \mu\text{m}^2$.

10.2 COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS

Se establecieron comparaciones entre los dos subgrupos principales de individuos: sujetos con función pulmonar normal (controles) y pacientes con EPOC. Posteriormente, y siempre que era posible, se realizó también la comparación adicional entre los sujetos con función pulmonar normal y el subgrupo de pacientes con EPOC más grave.

10.2.1 Características clínicas

No se observaron diferencias en los valores correspondientes a edad y datos antropométricos entre controles y EPOC. En los parámetros analíticos sólo se encontraron diferencias significativas en los valores de hemoglobina, superiores lógicamente en los pacientes con EPOC (Tablas 1 y 18).

10.2.2 Función pulmonar

Al analizar los datos de función pulmonar, comparando los controles con los pacientes con EPOC (y también con el subgrupo de pacientes con enfermedad más grave), se han observado las lógicas diferencias en los parámetros de obstrucción, atrapamiento aéreo y difusión, así como en los valores de PaO_2 (90 ± 8 frente a 83 ± 11 ; $p < 0.05$) (Tablas 2 y 19). La PaCO_2 y el pH no mostraron diferencias.

10.2.3 Fuerza, resistencia y reserva de los músculos respiratorios

La $\text{PI}_{\text{máx}}$ relativa estaba disminuída en el grupo de pacientes con EPOC, siendo además inferior a la de los controles. Sin embargo, no se observaron diferencias en los valores absolutos de las presiones, esofágica, gástrica ni transdiafragmática máximas. Similares resultados se observaron al comparar los sujetos controles con el subgrupo de EPOC más grave.

Tampoco existían diferencias en las variables de reserva muscular ($\overline{\text{PI}_{\text{es}}/\text{PI}_{\text{es máx}}}$; $\overline{\text{PI}_{\text{di}}/\text{PI}_{\text{di máx}}}$; TT_{MR} y TT_{di}).

En cuanto a los parámetros de resistencia sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas en la PMT entre controles y pacientes con EPOC. Estas diferencias eran más acentuadas al comparar a los primeros con los pacientes con EPOC más grave (PMT: -79 frente a -51 $\text{cm H}_2\text{O}$; $p < 0.001$). No existían diferencias en el Tlím (Tablas 4, 7, 20 y 21).

10.2.4 Fuerza de los músculos periféricos

Los pacientes con EPOC mostraron una fuerza disminuída en su extremidad superior no dominante, siendo además inferior a la de los sujetos control (Tablas 3 y 20).

10.2.5 Patrón ventilatorio

- a) Basal: No se observaron diferencias en ninguno de los parámetros ventilatorios en situación de reposo, entre sujetos controles y pacientes con EPOC.
- b) En esfuerzo: Se hallaron diferencias significativas en el V_t y \dot{V}_E entre ambos grupos (tablas 8 y 22).

10.2.6 Prueba ergométrica

La capacidad de esfuerzo se hallaba disminuída en los pacientes con EPOC, a la vez que tanto $\dot{V}O_2$ como $\dot{W}R$ eran inferiores a los de los controles (Tablas 8 y 22).

10.2.7 Variables morfométricas

- a) ***DIAFRAGMA*** (Tabla 9; gráficos 1 y 3)

No se observaron diferencias en los porcentajes (técnica inmunohistoquímica) ni tamaños fibrilares entre sujetos controles por un lado y pacientes con EPOC (o con el subgrupo de enfermedad más grave) por otro. En realidad, aunque los pacientes con EPOC y EPOC grave presentaban una tendencia a un mayor porcentaje de fibras tipo I que los controles, esta diferencia no era estadísticamente significativa. En todos los grupos las fibras eran de tamaño normal (40-60 μm).

- b) ***INTERCOSTAL EXTERNO*** (Tabla 10; gráficos 1 y 3)

A nivel del intercostal no se observaron diferencias en el porcentaje fibrilar (también por inmunohistoquímica) entre los tres grupos estudiados. Al analizar el tamaño de las fibras se observó un diámetro global mayor en los sujetos con EPOC que en los individuos controles (también era mayor el de las tipo II por separado y similar tendencia se observaba en las tipo I). Esta misma tendencia se observó cuando se compararon los sujetos control con los pacientes con EPOC más grave.

- c) ***DELTOIDES*** (Tabla 11; gráficos 1 y 3)

Se observó una tendencia a una disminución en el porcentaje de fibras oxidativas (inmunohistoquímica) y a una reducción en el tamaño fibrilar (significativa ésta última para las

de tipo II) en los pacientes con EPOC respecto a los controles. Similares tendencias se observaron al comparar con los pacientes con EPOC grave. En todos los grupos, sin embargo el tamaño fibrilar puede considerarse normal.

10.2.8 Actividad enzimática fibrilar (Tablas 12, 13 y 14; gráficos 1 y 2)

a) DIAFRAGMA

No se observaron diferencias significativas en la actividad ATPasa entre el grupo control y pacientes con EPOC o EPOC más grave.

b) INTERCOSTAL EXTERNO

A nivel del intercostal, los pacientes con EPOC presentaban una tendencia a mostrar un porcentaje de fibras con actividad ATPasa de tipo I menor que los sujetos control. Lo contrario sucedía con la actividad ATPasa de tipo IIa, que era significativamente mayor en los pacientes con EPOC y EPOC grave. Por el contrario, la actividad ATPasa de tipo IIx no era significativamente diferente entre pacientes con EPOC y controles.

c) DELTOIDES

No se observaron diferencias significativas en ningún caso.

10.2.9 Actividad enzimática muscular global (Tablas 12, 13 y 14; gráficos 4A y 4B)

a) DIAFRAGMA

En el diafragma no se observaron diferencias significativas en la actividad de la CS ni CPK entre sujetos control y pacientes con EPOC. Tampoco se evidenciaron diferencias entre controles y el grupo de pacientes con EPOC más grave. En cuanto a la actividad PFK, no se observaron diferencias entre los sujetos control y los EPOC (probablemente por la amplia dispersión de valores); pero sí con el subgrupo de enfermos con EPOC más grave, cuya actividad era sensiblemente inferior.

Cuando se analizó la LDH se observó una mayor actividad en sujetos con EPOC que en los controles, diferencia que se acentuaba al comparar el subgrupo de pacientes con EPOC más grave.

b) INTERCOSTAL EXTERNO

A nivel del intercostal externo los pacientes con EPOC presentaban una actividad oxidativa (valorada nuevamente por la medición de la CS) inferior a la de los sujetos sanos.

Esto era más acentuado en el subgrupo de pacientes con EPOC más grave. Al analizar la actividad de la CPK se observó mayor actividad en los pacientes con EPOC y EPOC más grave.

En cuanto a la actividad glicolítica (valorada por la medición de la PFK) se observó una tendencia (al límite de la significación) a ser mayor en pacientes con EPOC que en sujetos control. Esta tendencia llegaba a ser significativa en el subgrupo de pacientes con enfermedad más grave.

Cuando se analizó la LDH también se observó una tendencia a una actividad superior en los sujetos con EPOC frente a los controles. Esta tendencia se hacía significativa en el subgrupo de EPOC más grave.

c) DELTOIDES

La actividad de la CS mostró una fuerte tendencia a ser mayor en los pacientes con EPOC que en los controles. Al analizar los EPOC más graves, esta diferencia era estadísticamente significativa.

No se encontraron diferencias significativas, sin embargo, en la actividad de la CPK y PFK entre los distintos grupos. Por el contrario, se objetivaron diferencias significativas al analizar la actividad de la LDH al comparar los sujetos controles, tanto con pacientes con EPOC como con el subgrupo de EPOC más graves, con una actividad mayor en éstos dos últimos grupos.

10.2.10 Densidad capilar (Tablas 15, 16 y 17; gráfico 5)

a) DIAFRAGMA

La densidad capilar (expresada como número de capilares por fibra) fue mayor en los sujetos con EPOC y en el subgrupo de sujetos con enfermedad más grave en comparación con los sujetos sanos. Resultados complementarios se observaron al analizar otras variables, como la superficie irrigada por capilar y el número de capilares por área fibrilar.

b) INTERCOSTAL EXTERNO

A nivel del intercostal los pacientes con EPOC y aquellos con enfermedad más grave, presentaban un mayor número de capilares en comparación con sujetos sanos. Sin embargo, no se observaron diferencias al analizar variables como la superficie fibrilar por capilar y el número de capilares por área fibrilar.

c) DELTOIDES

Aunque los pacientes con EPOC y EPOC más grave presentaban una tendencia a una menor densidad capilar que los sujetos control, la diferencia no era estadísticamente significativa. El resto de parámetros analizados tampoco mostraron diferencias.

10.2.11 Comparación de los dos métodos de determinación de fibras oxidativas

a) DIAFRAGMA

A nivel del diafragma no se encontraron diferencias en el porcentaje de fibras tipo I tanto mediante la determinación de la expresión de la isoforma I de la cadena pesada de miosina como por actividad ATPasa en ninguno de los tres grupos estudiados.

b) INTERCOSTAL

El porcentaje de fibras tipo I por determinación de la expresión de MyHC-I mostraba una ligera tendencia a ser mayor que la obtenida por la técnica de ATPasa en los tres grupos de pacientes, aunque en ningún caso alcanzaba la significación estadística.

c) DELTOIDES

El porcentaje de fibras tipo I por determinación de ATPasa era similar al obtenido por expresión de la MyHC-I en el grupo control. Sin embargo el primer método daba valores superiores en los pacientes con EPOC y en el subgrupo con EPOC más grave.

10.2.12 Comparación de la capacidad oxidativa entre los tres músculos analizados

a. CONTROLES SIN ENFERMEDAD OBSTRUCTIVA

El diafragma presenta una capacidad oxidativa (cuando se analiza el porcentaje de fibras tipo I por determinación de MyHC) que tiene tendencia a ser inferior al intercostal ($p=0.07$) y similar a la del deltoides, sin que existan diferencias estadísticamente significativas. A su vez el intercostal tiende a una capacidad oxidativa superior a la del deltoides ($p=0.1$).

Cuando se valora la capacidad oxidativa por el porcentaje de fibras tipo I mediante la técnica de ATPasa, ésta es similar entre diafragma e intercostal, pero ambos muestran valores algo superiores al deltoides. No se han observado en ningún caso diferencias estadísticamente significativas.

Al analizar la actividad enzimática (CS) se observa que en el diafragma la capacidad oxidativa es similar a la del intercostal pero superior en ambos casos al deltoides ($p \leq 0.001$).

Por el contrario, la capacidad oxidativa valorada por la densidad capilar, es algo menor en el diafragma que en el intercostal y deltoides ($p=0.01$ y $p < 0.05$ respectivamente).

Es decir, en sujetos sanos los músculos respiratorios suelen mostrar una estructura más favorable a la capacidad oxidativa que el músculo periférico. La única excepción es la densidad capilar en el diafragma.

b. PACIENTES CON EPOC

El diafragma presenta una capacidad oxidativa (cuando se analiza el porcentaje de fibras tipo I por determinación de MyHC) que tiende a ser superior al deltoides ($p=0.08$) y similar al intercostal. Cuando se valora la capacidad oxidativa por el porcentaje de fibras tipo I mediante la técnica de ATPasa, ésta es similar en los tres músculos.

Al analizar la actividad enzimática (CS) se observa que en el diafragma la capacidad es similar a la del intercostal y superior a la del deltoides ($p=0.04$). El intercostal por su parte, muestra una capacidad oxidativa con tendencia a ser superior al deltoides ($p=0.1$).

La capacidad oxidativa, valorada por la densidad capilar, es similar en el diafragma que en el intercostal y muestra una tendencia a estar incrementada cuando se compara con el deltoides ($p=0.08$ y $p=0.1$, respectivamente).

Es decir, los músculos respiratorios muestran una tendencia generalizada (a excepción de la técnica de ATPasa) a tener una estructura más favorable a la actividad oxidativa que el deltoides. Esto es similar a lo observado en los sujetos controles descritos en el apartado anterior.

c. PACIENTES CON EPOC MÁS GRAVE

El diafragma presenta una capacidad oxidativa (cuando se analiza el porcentaje de fibras tipo I por determinación de su expresión en isoformas de MyHC) similar al intercostal y con tendencia a ser superior al deltoides ($p=0.06$). El intercostal muestra en la misma línea, una capacidad oxidativa con tendencia a ser superior a la del deltoides ($p=0.07$).

Cuando se valora la capacidad oxidativa por el porcentaje de fibras tipo I mediante la técnica de ATPasa, ésta muestra una ligera tendencia a ser superior en el diafragma con respecto al intercostal y deltoides.

Al analizar la actividad enzimática (CS) se observa que en el diafragma la capacidad oxidativa es superior a la del intercostal ($p=0.02$), y con tendencia a serlo a la del deltoides.

La capacidad oxidativa, valorada por la densidad capilar, es similar en el diafragma que en el intercostal y en ambos casos está incrementada cuando se compara con el deltoides ($p\leq 0.05$).

Es decir, en los pacientes graves y en algunos componentes (los estructurales: expresión de MyHC y capilares) la situación es similar a los controles sin enfermedad obstructiva y EPOC en general, con músculos respiratorios más favorables a la capacidad oxidativa que los periféricos. Sin embargo muestran una tendencia a que algunos de sus componentes oxidativos (en concreto los enzimáticos: ATPasa y CS) se hallen más desarrollados en el diafragma que en el intercostal, lo que constituye un rasgo diferencial con las otras poblaciones analizadas.

10.3 CORRELACIONES ENTRE LAS DIFERENTES VARIABLES

Las correlaciones se realizaron considerando, en primer lugar, la población total del estudio (incluyendo controles y pacientes con EPOC conjuntamente); y en segundo lugar, solamente el grupo de pacientes con EPOC.

10.3. A. MUSCULOS RESPIRATORIOS

A.1 DIAFRAGMA

10.3.1 Estructura muscular con función pulmonar

No se encontraron correlaciones significativas entre el grado de obstrucción (FEV_1 y cociente FEV_1/FVC) y los porcentajes y tamaños fibrilares en el diafragma. Sin embargo, existía una correlación negativa entre la resistencia de la vía aérea y el porcentaje de fibras tipo I ($r=-0,557$, $p\leq 0.05$; Figura 1).

No se observaron correlaciones entre los parámetros fibrilares y el grado de atrapamiento, así como tampoco con el nivel de gases sanguíneos. En cuanto a la difusión, sólo se encontró una relación positiva entre la Kco (considerado aquí como un marcador de enfisema) y el diámetro global de las fibras en el diafragma ($r=0,539$, $p\leq 0.05$; Figura 2).

Cuando se analizó por separado el grupo de **pacientes con EPOC** no se encontraron correlaciones entre los porcentajes fibrilares y el grado de obstrucción, ni el nivel de atrapamiento o los gases arteriales.

En cuanto a los tamaños fibrilares se observó una correlación negativa entre el diámetro de las fibras tipo I en el diafragma y el atrapamiento aéreo (RV: $r=-0,904$, $p\leq 0.01$; Figura 3) y positiva con la difusión ($DLco$: $r=0,903$, $p\leq 0.01$; Figura 4), ambos marcadores de enfisema; mientras que tanto el diámetro de las fibras tipo II como el global se correlacionó positivamente con el grado de obstrucción (FEV_1/FVC : $r=0,769$ y $r=0,743$, ambas $p\leq 0.05$; Figuras 5 y 6). Asimismo se encontró una correlación positiva entre el diámetro global de las fibras diafragmáticas y la difusión ($DLco$: $r=0,837$ y Kco : $r=0,923$, ambas $p\leq 0.01$; Figura 7).

10.3.2 Actividad enzimática con función pulmonar

Al valorar la totalidad de individuos no se observaron correlaciones entre la actividad enzimática de CS, CPK y PFK en el diafragma y el grado de obstrucción o la conductancia. Sin

embargo existía una correlación negativa entre la LDH y el grado de obstrucción (FEV_1 : $r=-0,576$, $p\leq 0.01$; Figura 8), que era algo más marcada al relacionarla con la conductancia (SGaw: $r=-0,648$, $p\leq 0.01$). Se encontró además una correlación positiva entre la LDH y el RV ($r=0,517$, $p\leq 0.05$), que era mayor con el también indicador de atrapamiento aéreo, el cociente RV/TLC ($r=0,599$, $p\leq 0.01$; Figura 9). Esta relación era inversa con la PFK ($r=-0,599$, $p\leq 0.05$; Figura 11). No se observaron correlaciones entre el atrapamiento aéreo y la CS y CPK. En cuanto a la difusión sólo se observó la existencia de una correlación inversa con la actividad de la LDH (DLco: $r=-0,533$, $p\leq 0.05$; Figura 10). No existían correlaciones entre los valores de DLco, Kco por un lado y el resto de enzimas, tanto oxidativos como glicolíticos por otro. Tampoco se objetivaron correlaciones entre la actividad enzimática muscular global en el diafragma y los niveles de PaO_2 y $PaCO_2$.

Al analizar la actividad enzimática fibrilar (actividad ATPasa) no se encontraron correlaciones de interés con ninguna variable clásica de función pulmonar.

Al valorar los mismos parámetros en el grupo de **pacientes con EPOC** sólo se encontró una correlación positiva entre los niveles de CPK y el grado de atrapamiento aéreo (RV: $r=0,882$, $p\leq 0.01$; Figura 12; la relación no era significativa con el cociente RV/TLC). Por otra parte se observó una correlación negativa entre los valores de actividad de la CPK en el diafragma y la difusión de CO (DLco: $r=-0,718$, $p\leq 0.05$; Figura 13). No se observaron correlaciones con ningún otro parámetro analizado. La actividad de la ATPasa por su parte, correlacionó exclusivamente con la SGaw; siendo de forma positiva en el caso de la ATPasa II ($r=0,631$, $p\leq 0.05$; Figura 14).

10.3.3 Densidad capilar con función pulmonar

La densidad capilar, expresada como el número de capilares por fibra en el diafragma, se correlacionó negativamente con el grado de obstrucción (FEV_1 : $r=-0,782$; FEV_1/FVC : $r=-0,694$, ambas $p\leq 0.01$; Figura 15) y la conductancia (SGaw: $r=-0,870$, $p\leq 0.01$); y de forma positiva con el grado de atrapamiento (RV: $r=0,585$, $p\leq 0.05$; RV/TLC: $r=0,780$, $p\leq 0.01$). También se observó una correlación negativa con la difusión (DLco: $r=-0,571$, $p\leq 0.05$; Figura 16) y la PaO_2 ($r=-0,568$, $p\leq 0.05$; Figura 17). Cuando se valoró el número de capilares por unidad de área fibrilar (capilares/ μm^2), se encontraron correlaciones de similares características,

aunque un poco menos intensas en el caso de la obstrucción (FEV_1 : $r=-0,663$, FEV_1/FVC : $r=-0,673$, las dos con $p\leq 0.05$; Figura 18).

No se halló ningún tipo de correlación significativa entre la densidad capilar en el diafragma y los valores de función pulmonar al analizar por separado el grupo de **pacientes con EPOC**.

10.3.4 Estructura muscular con función muscular y capacidad de ejercicio

En la población general del estudio no se hallaron correlaciones entre la función muscular respiratoria o la capacidad de ejercicio por una parte y el porcentaje y tamaño fibrilares por otra.

En el grupo de **pacientes con EPOC** tampoco existían correlaciones entre el porcentaje de fibras y los datos de función muscular respiratoria. Al analizar el tamaño, sí se encontró una correlación positiva entre el diámetro global de las fibras del diafragma y la resistencia de los músculos respiratorios (Tlím: $r=0,805$, $p\leq 0.05$; Figura 19). No se observó ninguna correlación entre el tamaño y porcentajes fibrilares con la capacidad de ejercicio.

10.3.5 Función muscular y capacidad de ejercicio con actividad enzimática

Al analizar la actividad oxidativa (CS) en el diafragma no se encontró ninguna correlación con los parámetros de función muscular respiratoria. La actividad glicolítica (PFK), en cambio, sí correlacionó de forma negativa con la resistencia (PMT: $r=-0,532$, $p\leq 0.05$; Figura 20) y de forma positiva con la fuerza (PIM: $r=0,456$, $p\leq 0.05$) muscular respiratorias. No se hallaron correlaciones entre CPK y función muscular respiratoria. La LDH solamente se correlacionó de forma positiva con la resistencia muscular (PMT: $r=0,638$, $p\leq 0.05$; Figura 21). No se encontraron correlaciones significativas entre función muscular respiratoria y actividad enzimática fibrilar (ATPasa) en el diafragma.

Por otra parte, no se observan correlaciones entre actividad oxidativa y capacidad de ejercicio global.

En el grupo de **pacientes con EPOC** no se encontraron correlaciones de interés entre los parámetros de función muscular respiratoria o ejercicio y actividad enzimática en el diafragma, tanto muscular global como fibrilar. No se objetivaron correlaciones al analizar la actividad enzimática fibrilar.

10.3.6 Densidad capilar con función muscular y capacidad de ejercicio

Al analizar el diafragma, solamente se observó una correlación positiva entre el número de capilares por área y la resistencia muscular respiratoria (PMT: $r=0,607$, $p\leq 0.05$; Figura 22). No se hallaron correlaciones entre función muscular respiratoria o capacidad de ejercicio y densidad capilar al analizar por separado el grupo de **pacientes con EPOC**.

10.3.7 Estructura muscular con metabolismo

⇒ ACTIVIDAD OXIDATIVA

En el diafragma, no se encontraron correlaciones de interés entre la actividad de la enzima oxidativa estudiada (CS) y la estructura muscular ni en cuanto a tamaño y porcentajes fibrilares, ni con la densidad capilar o la actividad enzimática fibrilar. Por el contrario, el porcentaje de fibras tipo I (con metabolismo predominantemente oxidativo) se correlacionó de forma positiva con la actividad ATPasa I ($r=0,588$, $p\leq 0.05$; Figura 23) y con el número de capilares por fibra ($r=0,617$, $p\leq 0.05$; Figura 24). La actividad de ATPasa I, por su parte, también se correlacionó de forma positiva con las variables de densidad capilar, tanto con el número de capilares por fibra ($r=0,770$, $p\leq 0.01$) como con el número de capilares por unidad de área fibrilar ($r=0,616$, $p\leq 0.05$).

En los **pacientes con EPOC** el porcentaje de fibras tipo I (inmunohistoquímica) se correlacionó positivamente con la ATPasa I ($r=0,758$, $p\leq 0.05$; Figura 25), pero no alcanzó significancia la relación con la densidad capilar. La ATPasa I por su parte, mantuvo su correlación con la densidad capilar, pero exclusivamente con el número de capilares por fibra ($r=0,908$, $p\leq 0.01$; Figura 26).

⇒ ACTIVIDAD GLICOLÍTICA

La actividad de la PFK se correlacionó de forma negativa con la actividad ATPasa I en el diafragma ($r=-0,526$, $p\leq 0.05$; Figura 27). La LDH, a su vez, se correlacionó positivamente con el número de capilares por fibra ($r=0,613$, $p\leq 0.05$; Figura 28) y capilares por área fibrilar ($r=0,621$, $p\leq 0.05$).

En el grupo de **EPOC** no se encontraron correlaciones de interés.

⇒ ALMACENAMIENTO ENERGÉTICO

En el diafragma, la actividad de la CPK se correlacionó de forma negativa con el diámetro de las fibras tipo I ($r=-0,817$, $p\leq 0.01$; Figura 29) y el tamaño fibrilar global ($r=-0,658$, $p\leq 0.05$; Figura 30).

En los pacientes con **EPOC** no se encontraron correlaciones de interés.

A.2 INTERCOSTAL EXTERNO

10.3.1 Estructura muscular con función pulmonar

No se encontraron correlaciones entre los porcentajes fibrilares en el intercostal y las variables de función pulmonar. Al analizar el tamaño fibrilar se encontró exclusivamente una correlación con la conductancia, que era negativa tanto para las fibras tipo I como las tipo II (SGaw: $r=-0,502$, $p\leq 0.05$ en ambas; Figura 32) y el diámetro fibrilar global ($r=-0,518$, $p\leq 0.05$; Figura 31).

En el grupo de **pacientes con EPOC** no se encontró ningún tipo de correlación entre los tamaños y porcentajes fibrilares en el intercostal con el grado de obstrucción, atrapamiento aéreo, difusión y gases arteriales.

10.3.2 Actividad enzimática con función pulmonar

Globalmente, y a nivel del intercostal se encontraron correlaciones positivas entre la actividad oxidativa (CS) y tanto el grado de obstrucción (FEV_1 : $r=0,620$, $p\leq 0.05$; Figura 33) como la conductancia (SGaw: $r=0,601$, $p\leq 0.05$). Con el nivel de atrapamiento sólo se observó una tendencia a la correlación negativa (RV/TLC: $r=-0,538$, $p=0.07$). La actividad de la PFK a su vez, mostró una fuerte tendencia a la correlación negativa con el grado de obstrucción (FEV_1 : $r=-0,518$, $p=0.08$; Figura 34) y la conductancia (SGaw: $r=-0,528$, $p=0.07$); tendencia que era positiva con el nivel de atrapamiento (RV: $r=0,528$, $p=0.08$; Figura 35).

Al analizar la actividad de la CPK en el intercostal se objetivó una correlación negativa con el grado de obstrucción (FEV_1 : $r=-0,743$ y FEV_1/FVC : $r=-0,811$, $p\leq 0.01$ en ambas; Figura 36), la conductancia (SGaw: $r=-0,601$, $p\leq 0.05$) y la difusión (DLco: $r=-0,682$, $p\leq 0.05$; Figura 37). Esta correlación era positiva con el nivel de atrapamiento (RV: $r=0,571$ y RV/TLC: $r=0,565$, $p\leq 0.05$ en ambas; Figura 38). En cuanto a la LDH no se observó correlación significativa con la obstrucción (FEV_1) pero sí de forma negativa con la conductancia (SGaw: $r=-0,579$, $p\leq 0.05$; Figura 39). Tampoco se observó ningún tipo de correlación entre la actividad de la LDH en el intercostal y la capacidad de difusión. Finalmente no se encontró ningún tipo de correlación entre la actividad enzimática global y los valores de gases arteriales.

A su vez, la actividad ATPasa mostró correlaciones sólo a expensas de la proporción de fibras de tipo IIa, que correlacionó de forma negativa con el grado de obstrucción y

conductancia de la vía aérea (FEV_1 : $r=-0,596$; FEV_1/FVC : $r=-0,475$, $p\leq 0,05$; Figura 40 y SGaw: $r=-0,587$, $p\leq 0,05$ en todos los casos), y positiva con el grado de atrapamiento aéreo (RV: $r=0,713$, $p\leq 0,01$; RV/TLC: $r=0,534$, $p\leq 0,05$; Figura 41). Los porcentajes de fibras tipo I y IIb (según la técnica de ATPasa) en el intercostal no correlacionaron con los parámetros funcionales.

En el grupo específico de **pacientes con EPOC** no se encontró ninguna correlación entre la actividad enzimática muscular global del intercostal y los datos de función pulmonar. Al analizar la actividad de la ATPasa solamente se observó una correlación con el grado de atrapamiento (RV/TLC), pero con distinto comportamiento según el tipo fibrilar, positiva en el caso de la ATPasa de tipo IIa ($r=0,615$, $p\leq 0,05$; Figura 42) y negativa en el caso de la IIx ($r=-0,632$, $p\leq 0,05$; Figura 43).

10.3.3 Densidad capilar con función pulmonar

A nivel del músculo intercostal solamente se objetivó una correlación negativa entre el número de capilares por fibra y tanto el grado de obstrucción (FEV_1 : $r=-0,594$, $p\leq 0,05$; Figura 44) como la conductancia (SGaw: $r=-0,517$, $p\leq 0,05$). El número de capilares por unidad de área fibrilar mostró una fuerte tendencia a la correlación negativa con la transferencia del CO (DLco: $r=-0,504$, $p=0,06$).

No se encontraron correlaciones de interés en el subgrupo de **pacientes con EPOC**.

10.3.4 Estructura muscular con función muscular y capacidad de ejercicio

En el músculo intercostal no se encontraron correlaciones entre la función muscular respiratoria o la capacidad de ejercicio y los porcentajes y tamaños fibrilares.

10.3.5 Función muscular y capacidad de ejercicio con actividad enzimática

A nivel del intercostal no se encontraron correlaciones entre función muscular respiratoria y actividad de la CS o la PFK. La LDH correlacionó exclusivamente y de forma negativa con la reserva muscular (TT_{MR} : $r=-0,596$, $p\leq 0,05$). La CPK, a su vez, se relacionó positivamente tanto con la resistencia (PMT: $r=0,585$, $p\leq 0,05$; Figura 45) como con la reserva muscular respiratoria (TT_{MR} : $r=0,611$, $p\leq 0,05$).

En cuanto a la actividad enzimática fibrilar del intercostal se observó exclusivamente una correlación entre la ATPasa tipo IIa y la resistencia muscular respiratoria (PMT: $r=0,613$, $p\leq 0.05$; Figura 46).

En el grupo de pacientes con **EPOC** no se encontraron correlaciones entre función muscular y actividad oxidativa. Al analizar la actividad glicolítica del intercostal se hallaron correlaciones entre la PFK y la resistencia (Tlím: $r=0,762$, $p\leq 0.05$; Figura 47); y entre la CPK o la LDH y la reserva muscular (TT_{MR} : $r=0,982$, $p\leq 0.01$; Figura 48, $r=-0,743$, $p\leq 0.05$, respectivamente). No se observó ninguna correlación entre actividad enzimática fibrilar en el intercostal y parámetros de función muscular respiratoria. Las actividades enzimáticas y la capacidad de ejercicio se correlacionaron de forma similar en este subgrupo que al analizar la población total. No se encontraron correlaciones de interés entre la capacidad de ejercicio y la actividad enzimática fibrilar.

10.3.6 Densidad capilar con función muscular y capacidad de ejercicio

En el intercostal se encontró una débil correlación negativa entre el número de capilares por área fibrilar y la resistencia muscular respiratoria (expresada como Tlím), tanto en el total de la población ($r=-0,513$, $p\leq 0.05$) como en el grupo de **EPOC** analizado por separado ($r=-0,691$, $p\leq 0.05$). No se observaron otras correlaciones de interés entre densidad capilar y el resto de variables de función muscular respiratoria, así como tampoco con la capacidad global de ejercicio.

10.3.7 Estructura muscular con metabolismo

⇒ ACTIVIDAD OXIDATIVA

La actividad de la CS se correlacionó de forma negativa con la de la LDH en el intercostal ($r=-0,682$, $p\leq 0.05$). No se han encontrado correlaciones entre la actividad oxidativa, valorada por la CS, y la densidad capilar. El porcentaje de fibras tipo I (inmunohistoquímica) no se correlacionó con ninguno de los otros parámetros analizados.

En el grupo de pacientes con **EPOC**, la actividad de la CS en el intercostal se correlacionó de forma negativa con la actividad de la ATPasa IIa ($r=-0,738$, $p\leq 0.05$). No se hallaron correlaciones con la densidad capilar. Por otra parte, el porcentaje de las fibras tipo II

(inmunohistoquímica) se correlacionó con la actividad de la ATPasa II global ($r=0,648$, $p\leq 0.05$; Figura 49).

⇒ ACTIVIDAD GLICOLÍTICA

La actividad de la PFK en el intercostal se correlacionó positivamente con la de la LDH ($r=0,594$, $p\leq 0.05$; Figura 50). Ésta última también se correlacionó directamente con la actividad ATPasa IIa ($r=0,807$, $p\leq 0.01$; Figura 51). Asimismo mostró una tendencia a la correlación negativa con el porcentaje de fibras de tipo I ($r=-0,581$, $p=0.07$; Figura 52).

En los pacientes con **EPOC** no se encontró ninguna correlación de interés al analizar la actividad de la PFK. La de la LDH sin embargo, correlacionó de forma positiva con la ATPasa IIa ($r=0,809$, $p\leq 0.05$; Figura 53).

⇒ ALMACENAMIENTO ENERGÉTICO

Al analizar el músculo intercostal, la actividad de la CPK mostró una tendencia a la correlación positiva con el número de capilares por fibra ($r=0,532$, $p=0.09$; Figura 54).

10.3. B. MUSCULOS PERIFÉRICOS

B.1 DELTOIDES

10.3.1 Estructura muscular con función pulmonar

No se encontraron correlaciones entre los parámetros de función pulmonar y los porcentajes fibrilares en el deltoides. Al analizar el tamaño de las fibras sólo se observó una correlación positiva entre el tamaño de las de tipo II y tanto el grado de obstrucción bronquial (FEV_1 : $r=0,602$ y FEV_1/FVC : $r=0,728$, ambas $p\leq 0.05$; Figuras 55 y 56) como la conductancia ($SGaw$: $r=0,719$, $p\leq 0.05$). Esta correlación era negativa con el grado de atrapamiento (RV : $r=-0,664$ y RV/TLC : $r=-0,670$, $p\leq 0.05$; Figura 57). El tamaño de las fibras tipo II también correlacionó de forma positiva con la capacidad de difusión (Kco : $r=0,712$, $p\leq 0.05$). No existía ninguna correlación entre el tamaño fibrilar y los valores de los gases en sangre arterial.

En el grupo de **pacientes con EPOC** sólo se encontró una correlación positiva entre el diámetro global de las fibras del deltoides y la conductancia específica ($SGaw$: $r=0,992$, $p\leq 0.01$; Figura 58).

10.3.2 Actividad enzimática con función pulmonar

La actividad oxidativa en el músculo deltoides (CS) se correlacionó de forma negativa con el grado de obstrucción al flujo aéreo (FEV_1 : $r=-0,663$ y FEV_1/FVC : $r=-0,613$, $p\leq 0.01$ en ambas; Figura 59) y la conductancia ($SGaw$: $r=-0,630$, $p\leq 0.01$), y de forma positiva con el grado de atrapamiento (RV/TLC : $r=0,567$, $p\leq 0.05$; Figura 60. No existía correlación con el RV). La actividad de la CPK no mostró correlaciones de interés.

Al analizar la actividad glicolítica en el deltoides, no se encontraron correlaciones entre los valores de PFK y los parámetros respiratorios. Sin embargo, la LDH mostró un comportamiento similar al de la CS, con correlación negativa con el grado de obstrucción (FEV_1 : $r=-0,600$ y FEV_1/FVC : $r=-0,623$, $p\leq 0.01$ en ambas; Figura 61) y la conductancia ($SGaw$: $r=-0,643$, $p\leq 0.01$), siendo positiva con el atrapamiento aéreo (RV : $r=0,549$ y RV/TLC : $r=0,600$, $p\leq 0.05$ en los dos casos; Figura 62). Asimismo se observó una relación negativa entre la LDH y la difusión ($DLco$: $r=-571$ y Kco : $r=-580$, ambas $p\leq 0.05$; Figura 63). No se encontraron correlaciones entre los valores de PaO_2 y $PaCO_2$ y la actividad enzimática global del músculo deltoides.

Al analizar por separado los **pacientes con EPOC** sólo se encontraron correlaciones entre la actividad de la CS y el grado de obstrucción (FEV_1 : $r=-0,716$, $p\leq 0.05$; Figura 64); entre la actividad de la CPK y el atrapamiento (RV: $r=0,914$, $p\leq 0.01$; Figura 65) o la difusión del CO (DLco: $r=-0,734$, $p\leq 0.05$; Kco: $r=-0,813$, $p\leq 0.01$; Figura 66).

La actividad enzimática fibrilar del deltoides no se correlacionó con ningún parámetro de función pulmonar ni en el total de la población analizada ni en el grupo de pacientes con EPOC.

10.3.3 Densidad capilar con función pulmonar

No se observó ningún tipo de correlación entre los parámetros de función pulmonar y la densidad capilar en el deltoides, tanto en el total de individuos como en el grupo específico de **pacientes con EPOC**.

10.3.4 Estructura muscular con función muscular y capacidad de ejercicio

No se han encontrado correlaciones entre el tamaño y porcentaje de las fibras musculares en el músculo deltoides y la función muscular periférica y capacidad de ejercicio, tanto en el total de sujetos como específicamente en el subgrupo de pacientes con EPOC.

10.3.5 Función muscular y capacidad de ejercicio con actividad enzimática

En el músculo deltoides no se encontraron correlaciones entre función muscular periférica y actividad enzimática global. Tampoco se hallaron correlaciones entre los parámetros de función muscular periférica y actividad enzimática fibrilar (ATPasa) del deltoides.

Al valorar la capacidad de ejercicio no se observó ninguna correlación con la actividad oxidativa. En el caso de la actividad glicolítica, solamente se encontró una correlación negativa con la LDH ($r=-0,577$, $p\leq 0.05$). No se han observado correlaciones entre la capacidad de ejercicio y la actividad enzimática fibrilar.

En los **pacientes con EPOC** no se encontró ninguna correlación entre la función muscular periférica y la actividad enzimática en el deltoides, tanto a nivel muscular global como fibrilar.

10.3.6 Densidad capilar con función muscular y capacidad de ejercicio

A nivel del músculo deltoides no se ha hallado ningún tipo de correlación entre los parámetros de función muscular periférica o capacidad de ejercicio y la densidad capilar, tanto en la población total como en el subgrupo de pacientes con EPOC.

10.3.7 Estructura muscular con metabolismo

⇒ ACTIVIDAD OXIDATIVA

No se observaron correlaciones entre la actividad de la CS y las variables de tamaño y porcentaje fibrilar, actividad ATPasa o densidad capilar en el músculo deltoides. El porcentaje de fibras tipo I (inmunohistoquímica) solamente se correlacionó de forma negativa con la actividad de la LDH ($r=-0,757$, $p\leq 0.01$; Figura 67). No se han hallado otras correlaciones de interés.

⇒ ACTIVIDAD GLICOLÍTICA

A nivel del deltoides se ha encontrado una correlación positiva entre las actividades de la PFK y de la CPK ($r=0,675$, $p\leq 0.01$). La LDH por su parte, se correlacionó de forma negativa con el porcentaje de fibras tipo I ($r=-0,757$, $p\leq 0.01$).

En los pacientes con **EPOC**, la PFK se correlacionó de forma positiva con el diámetro de las fibras tipo II ($r=0,658$, $p\leq 0.05$). La actividad de la LDH en el deltoides, sin embargo, no mostró ninguna correlación con las variables analizadas.

⇒ ALMACENAMIENTO ENERGÉTICO

La actividad de la CPK no mostró correlaciones con el resto de parámetros analizados. En los pacientes con **EPOC** solamente correlacionó positivamente con el porcentaje de fibras de tipo I en el deltoides ($r=0,989$, $p\leq 0.01$; Figura 68).

DISCUSIÓN

11 DISCUSIÓN

Nuestro trabajo demuestra que los diferentes componentes estructurales y metabólicos que potencialmente pueden contribuir a la capacidad oxidativa de un músculo se **adaptan** de forma **heterogénea** (tanto cada uno de ellos con respecto a los otros, como en cada músculo en particular respecto de los músculos de otros territorios, e incluso como variabilidad adaptativa inter-individual) en los pacientes con EPOC.

En concreto, hemos observado una estabilidad con discreta tendencia al aumento en el porcentaje de fibras de metabolismo predominantemente oxidativo (tipo I, identificadas por la expresión de la isoforma lenta de MyHC) en el diafragma de los pacientes con EPOC. En el intercostal externo y deltoides se mantiene la proporción de estas fibras, aunque con ligera tendencia a la disminución. Por otra parte, el tamaño de las fibras oxidativas se mantiene en el diafragma, tendiendo a aumentar en el intercostal y a disminuir en el deltoides de los pacientes con EPOC. Respecto a la actividad enzimática oxidativa, está conservada en el diafragma de los pacientes con EPOC, aunque disminuye en el intercostal y muestra tendencia a aumentar en el deltoides. Finalmente, la densidad capilar aumenta en todos los músculos incluidos en el estudio.

En general los estudios que han valorado la capacidad oxidativa muscular lo han hecho analizando por separado cada uno de los factores que intervienen en la misma, ya sean los tipos fibrilares, la actividad enzimática muscular, la densidad capilar u otros.

A continuación se analizan los cambios observados para nivel y músculo, estableciendo dos grandes grupos: músculos respiratorios (diafragma e intercostal) y de las extremidades (deltoides). En realidad, se ha preferido el estudio de un músculo de las extremidades superiores, por dos razones. La primera, la creciente impresión de que éste es un territorio "mixto" de gran interés, en el que coexisten cambios sistémicos con otros regulados por factores locales. Esto lo convierte en un excelente modelo para la discusión de los factores implicados en la remodelación muscular en la EPOC. La segunda, el hecho de que los músculos de las extremidades inferiores ya han sido extensamente analizados por otros autores en muchos de los puntos que integran los objetivos del presente trabajo. Concretamente varios

trabajos de Maltais¹²¹ y Jakobsson¹⁰⁶, entre otros, han valorado diversos aspectos a nivel del cuádriceps, basándose en el hecho de que los pacientes con EPOC presentan una menor tolerancia al esfuerzo y este músculo estaría directamente implicado en la capacidad de ejercicio. Este hecho vendría determinado por una disfunción en la musculatura periférica de las extremidades inferiores, bien por lo que se ha dado en denominar "desacondicionamiento" como por la existencia de una alteración intrínseca a nivel del propio músculo. Por razones éticas, además, consideramos que era inviable la toma de la muestra de un cuarto músculo (el cuádriceps) en nuestros pacientes.

El deltoides, como muchos de los músculos de las extremidades superiores, no participa en actividades como la deambulación y por ello no se ha considerado habitualmente como un factor relevante en la limitación al ejercicio. Podría actuar como un músculo accesorio de la inspiración en los pacientes con EPOC. Así se ha demostrado que en los sujetos con EPOC grave el deltoides sería reclutado cuando respiran frente a cargas inspiratorias incrementales. Esto no sucede en individuos sanos, por tanto, el estudio de este músculo puede ayudar a clarificar por una parte si los cambios que induce la EPOC sobre los músculos esqueléticos son homogéneos a nivel de los distintos grupos musculares; y por otra, si a este nivel existen factores locales que puedan determinar los cambios, o éstos forman parte de un efecto sistémico de la EPOC sobre los músculos periféricos.

11.1 MÚSCULOS RESPIRATORIOS

11.1.1 DIAFRAGMA

Los pacientes con EPOC muestran un porcentaje de fibras de tipo I (expresado por ATPasa o MyHC I) cuanto menos preservado, y con una cierta tendencia al aumento. Algo similar fue descrito por Levine¹⁹, aunque este autor observó un incremento significativo en los pacientes con EPOC grave, lo que estaría en relación con la sobrecarga crónica que suponen las cargas derivadas de la obstrucción de las vías aéreas e hiperinsuflación pulmonar. Reflejaría probablemente un fenómeno adaptativo del diafragma, en un intento de mejorar su capacidad aeróbica (es decir, su resistencia). Se sabe que las fibras de tipo I tienen una capacidad oxidativa superior a la de las fibras de tipo II, lo que permite una actividad sostenida por su gran resistencia a la fatiga. Las pequeñas diferencias con el estudio de Levine probablemente se deban a la selección de pacientes y/o eventuales diferencias relacionadas con el origen de la población. Así, en un trabajo anterior nuestro grupo sólo halló cambios discretos en la expresión de los genes de la MyHC-I en sujetos con EPOC moderada-grave del área mediterránea (Gea¹⁶⁵). Además, en nuestro presente trabajo los pacientes con el subgrupo de enfermedad más grave presentaban un FEV₁ ligeramente mayor que el de Levine (38% frente a 33%) lo que podría influir en la menor magnitud de los cambios.

Al analizar el tamaño fibrilar no se hallaron diferencias entre los pacientes con EPOC y los sujetos controles. Es decir, el tamaño se hallaba cuanto menos preservado en los primeros como grupo. Esto era así tanto para el tamaño global como para el correspondiente a las fibras de tipo I y II por separado, y difiere de los hallazgos de Sánchez¹¹⁹ según el cual los pacientes con EPOC presentaban un diámetro fibrilar menor, y éste se correlacionaba a su vez con el valor del FEV₁. Según estos últimos datos se podría establecer que la EPOC actuaría ejerciendo un efecto de “desentrenamiento” sobre el diafragma. Esto vendría reforzado por el hecho de que este mismo autor también observó una disminución en la actividad enzimática muscular. En el mismo sentido, en nuestro estudio sí hemos hallado una relación significativa entre tamaño y deterioro funcional. En concreto, las fibras tendían a ser menores en los sujetos con mayor deterioro (obstrucción bronquial, atrapamiento aéreo o alteraciones en la difusión, más

marcados). Es decir, en el grupo concreto de pacientes con EPOC sí parecería confirmarse los hallazgos de Sánchez, pero más de una forma progresiva al deterioro funcional que cualitativa por la presencia de enfermedad.

Al analizar la actividad enzimática oxidativa global (en concreto, la de la CS) se observó que ésta se hallaba conservada, aunque con una ligera tendencia a la disminución en los pacientes con EPOC grave. Es decir, la tendencia era la contraria a la observada en las poblaciones fibrilares. La actividad de la enzima no se correlacionó con ninguno de los parámetros de función pulmonar analizados. Nuestros hallazgos son similares a los publicados por Pastó¹³ e indicarían que la actividad enzimática oxidativa no sigue el mismo proceso adaptativo de otros factores. Otros autores (Sánchez¹²⁴) han observado algo similar, aunque con disminuciones más marcadas de la capacidad oxidativa en el diafragma de sujetos con EPOC. Esto sería compatible con la hipótesis de que, a nivel enzimático, predominen factores sistémicos de índole deletérea, que serían sólo parcialmente contrarrestados por el entrenamiento. También con el hecho de que la regulación de los factores enzimáticos (en la mayoría de ocasiones, el microambiente hístico) es diferente del de las proteínas estructurales (fundamentalmente, el tipo e intensidad de la actividad mecánica). Por otra parte, el mismo grupo antes mencionado halló resultados diferentes a nivel del *latissimus dorsi* y el intercostal, donde la actividad enzimática oxidativa estaba incrementada. Esto sugeriría a su vez, que los cambios en los diferentes músculos esqueléticos de los pacientes con EPOC varían en función del grupo estudiado y que si bien existen factores sistémicos comunes (p.e. mediadores inflamatorios), éstos estarían modulados por factores locales en cada músculo, que guardarían relación con la gravedad de la EPOC.

Por otra parte, la actividad de la PFK (enzimas clave de la vía glicolítica) se halla marcadamente disminuída en los pacientes con EPOC grave, tendencia que ya es apreciable en la población global de enfermos con EPOC. Además, esta disminución es proporcional al grado de deterioro de la función pulmonar. Esto sería probablemente un reflejo de la transformación que se produce en estos pacientes donde las fibras de tipo II, glicolíticas y de contracción rápida, muestran una tendencia a ser sustituidas por fibras de metabolismo predominantemente oxidativo. Otro posible mecanismo que explique la disminución en la PFK es que esta enzima se

ve inhibida por niveles altos de ATP, como los que se producen durante la contracción muscular y por el descenso del pH, que pueden estar ocasionalmente presente en los pacientes con EPOC más grave.

Por otra parte, en nuestro estudio se observó un incremento en la actividad de la LDH. Este aumento era proporcional además al grado de deterioro funcional. La LDH cataliza una reacción bidireccional entre piruvato y lactato y su actividad estaría modulada por una parte por el tipo de actividad física y por otra por la hipoxia crónica (Jakobsson¹⁰⁶). Así tanto el entrenamiento "de resistencia" como la disminución en la PaO₂ provocarían un incremento en la actividad de esta enzima. Ambas circunstancias, obviamente pueden estar presentes en los pacientes con EPOC. A título especulativo y a nivel metabólico, el hecho de que la actividad de la LDH se incremente al avanzar la enfermedad, podría favorecer un mayor paso hacia piruvato, lo que reintegraría sustrato al ciclo de Krebs y permitiría mantener en presencia de oxígeno, una producción energética correcta.

La actividad de la CPK (enzima indicador de la capacidad de almacenamiento energético) no parece modificarse en el diafragma de los pacientes con EPOC respecto de los sujetos control. Sin embargo, sí que se observó una tendencia a incrementarse en presencia de marcado deterioro funcional (correlación directa con el RV en pacientes con EPOC). Esto podría indicar una adaptación en casos extremos, posiblemente explicable por la necesidad de generar más energía necesaria para la contracción muscular.

Por último, la densidad capilar sí se halló aumentada en los pacientes con EPOC. Esto facilitaría un mayor aporte de oxígeno al músculo, aún en presencia de contenidos de este gas disminuídos en sangre arterial. Esta respuesta sería además mayor a medida que aumentase el grado de enfermedad (relación directa con el grado de obstrucción). Trabajos anteriores de nuestro grupo ya habían descrito un incremento en la densidad capilar tanto en el diafragma como en el intercostal externo, que eran además proporcionales al grado de alteración ventilatoria. La génesis de vasos sanguíneos sería una respuesta adaptativa al "efecto" ejercicio y estaría mediada por una serie de factores cuyos mecanismos reguladores no están del todo aclarados (Gustafsson¹³²).

Un hallazgo interesante es la buena relación entre los porcentajes de fibras oxidativas (tanto valorados por el método de expresión de proteínas estructurales como por el de actividad metabólica) y la densidad capilar. Esto parece indicar que a pesar de los diversos factores reguladores, y de las eventuales diferencias entre los elementos de expresión de la capacidad oxidativa, parece existir una convergencia adaptativa entre la mayoría de ellos. Aunque menos, existen además correlaciones con la actividad enzimática global.

En resumen, el diafragma humano muestra en presencia de EPOC algunos cambios adaptativos que globalmente facilitarían la preservación de su capacidad oxidativa. Algunos de estos cambios son proporcionales al grado de deterioro de la función respiratoria. Por otra parte, se trata de cambios no muy marcados (con excepción de los observados en la densidad capilar), y heterogéneos en su magnitud, según el elemento analizado. Probablemente, esto último sea debido a los múltiples y diferentes factores implicados en la génesis de los cambios en cada uno de ellos.

11.1.2 MÚSCULO INTERCOSTAL EXTERNO

Al analizar el porcentaje de fibras de tipo I no se hallaron cambios asociados a la presencia de EPOC, aunque la tipificación enzimática mostraba una tendencia a un menor porcentaje de fibras oxidativas. Sin embargo, los pacientes más graves tendían a presentar un mayor porcentaje de fibras tipo IIa. Probablemente las pequeñas diferencias observadas con el diafragma (donde existía una ligera tendencia al aumento de las fibras de tipo I) se deban a la actividad de cada uno de estos músculos en los pacientes con EPOC. Así, el diafragma es el principal músculo inspiratorio mientras que el intercostal intervendría de forma intermitente y en menor medida en el proceso respiratorio. Sin embargo, en aquellas situaciones en las que se produce un incremento de la resistencia inspiratoria (como ocurre en la EPOC) o en las demandas ventilatorias (como sucedería durante el ejercicio), el intercostal tendría un papel progresivamente más importante (De Troyer¹⁶⁶). En anteriores estudios realizados por nuestro grupo (Aguar¹⁵, Gea⁴¹) hemos observado que la activación de este músculo es diferente que la del diafragma, y esto se traduce en la tendencia al incremento en la expresión de miosina tipo II. Probablemente esto se explique por el reclutamiento intermitente y de alta intensidad asociado a unos mayores requerimientos ventilatorios.

Un mayor grado de enfermedad implicaría pues, la presencia de mayor porcentaje de fibras de contracción rápida y alta potencia de contracción. Esto tendría indudables ventajas funcionales, al proporcionar al sistema un elemento de fuerza intermitente, que podría actuar en caso de ser requerido. Este elemento sería además **complementario** del observado en el diafragma, donde la tendencia a un mayor porcentaje de fibras oxidativas facilitaría la labor continuada. Un punto de especial interés es la razón por la que existe una discreta discrepancia entre las tipificaciones por proteínas estructurales y el método metabólico. Esto puede nuevamente explicarse por la diferente aproximación que ambos realizan al mismo fenómeno (potencial oxidativo). Esta diferente aproximación implica además diferentes factores reguladores de la adaptación en cada caso. No obstante, y de forma intraindividual, debería existir una buena relación entre ambos métodos. En nuestro caso, el análisis de ambas técnicas ha mostrado una buena correlación interna.

En cuanto al tamaño de las fibras del intercostal, éste fue mayor en los sujetos con EPOC, tanto desde una óptica global como respecto de las fibras de tipo I y de tipo II por separado. El tamaño era además proporcional a la resistencia en la vía aérea, sugiriendo un mecanismo causal. Estos resultados también concuerdan con los observados anteriormente por nuestro grupo (Aguar¹⁵), así como estudios precedentes realizados en modelos animales (Decramer¹⁶⁷). Como ocurría en el caso de los porcentajes fibrilares, la situación difería de la observada en el diafragma, donde el tamaño fibrilar se hallaba apenas conservado. Nuevamente las diferentes acciones de ambos músculos explicarían estas diferencias. El diafragma estaría sometido a la combinación de un "entrenamiento de resistencia" (estímulo de menor intensidad pero por tiempo prolongado), que favorecería el paso de fibras tipo II a tipo I, y a efectos deletéreos sistémicos. El intercostal, por el contrario, estaría sometido a un "entrenamiento de fuerza" (estímulo de alta intensidad, corta duración y de forma intermitente, con períodos intercalados de descanso) lo que favorecería el predominio de fibras tipo II y el mayor tamaño celular.

Al analizar la actividad enzimática oxidativa global (CS) se observó que estaba disminuída en los pacientes con EPOC en comparación con sujetos sanos y se correlacionaba de forma positiva con el grado de obstrucción y la resistencia en la vía aérea. Es decir, la EPOC provocaría en el intercostal cambios diferentes de los observados en el diafragma costal. En este último, la enfermedad se asocia al aumento (Sánchez¹²⁵) o al menos, preservación (Pastó¹²⁶) de la capacidad enzimática oxidativa. Por el contrario, parece que la situación es justamente la contraria en el intercostal, asociándose la presencia y gravedad de la enfermedad respiratoria a una menor capacidad oxidativa. Esto concuerda perfectamente con los hallazgos realizados por el presente y otros estudios de nuestro mismo grupo respecto de los otros componentes estructurales o metabólicos ligados al potencial oxidativo. Nuestros resultados estarían nuevamente en relación con el tipo de actividad del intercostal. Como ya se ha mencionado, este músculo interviene de forma intermitente en la ventilación, justamente al aumentar las demandas. Por tanto, su función sería más de proporcionar un suplemento de fuerza al sistema cuando fuera requerido. Esta característica funcional parece concordar perfectamente con el hecho de que las fibras aumenten de tamaño, tiendan a virar hacia las de

actividad glicolítica y disminuyan la actividad de sus enzimas oxidativos. Sin embargo, nuestros hallazgos sobre la actividad de la citrato sintasa en el intercostal difieren de los obtenidos previamente por Sánchez¹²⁵, quien observó precisamente lo contrario, un incremento en la actividad de la enzima con la enfermedad pulmonar. Este aumento correlacionaba además de forma negativa con el grado de obstrucción y de forma positiva con los volúmenes pulmonares. Sin embargo, hay que recordar que el grupo de pacientes estudiados por Sánchez presentaban una enfermedad de grado moderado, y quizás esto haya influido en el grado y patrón de reclutamiento muscular.

En cuanto a los enzimas de la vía glicolítica, la PFK estaría aumentada en los pacientes con EPOC en comparación con los sujetos sanos, correlacionando de forma negativa con el nivel de obstrucción. Nuevamente este comportamiento es coherente con lo observado en la vía oxidativa y difiere de las observaciones realizadas en el diafragma, donde la actividad glicolítica disminuye a medida que empeora la enfermedad pulmonar. Algo similar ocurre con la LDH, cuya actividad también está incrementada en los pacientes con EPOC, correlacionando de forma negativa con el grado de resistencia en la vía aérea. Aquí cabe añadir que además de concordar con el resto de hallazgos, al ser una enzima que cataliza una reacción bidireccional, permitiría recuperar sustrato para la vía oxidativa si fuese necesario.

Por último, la capacidad enzimática de la CPK está aumentada en el intercostal de los pacientes con EPOC en comparación con los sujetos con buena función pulmonar. Este cambio es además proporcional a la gravedad de la afectación funcional y permitiría disponer de mayores reservas energéticas a los pacientes con enfermedad grave.

Respecto del número de capilares, y confirmando trabajos anteriores de Jiménez et al⁸⁷, éste es mayor en los pacientes con EPOC en relación con los sujetos control, correlacionando negativamente con el grado de obstrucción. Esto favorecería un mejor aporte de oxígeno al facilitar el flujo al músculo, lo que eventualmente podría estar en relación con la actividad reversa de la LDH y en el mismo terreno especulativo, con el incremento de reserva energética (cambios en la actividad de la CPK) también observados en este estudio.

En resumen, el intercostal muestra una tendencia a incrementar el número de fibras glicolíticas o mixtas, así como el tamaño fibrilar. El paso a actividad glicolítica es mucho más

evidente a nivel enzimático. Estos cambios irían ligados a la actividad de este músculo y facilitaría un suplemento de fuerza y velocidad al sistema en situaciones de compromiso.

Por otra parte, el sistema vascular periférico se comportaría de forma similar a como lo hace en el diafragma, aumentando su densidad. Esto ayudaría a mantener un adecuado aporte energético.

11.2 MÚSCULOS PERIFÉRICOS

11.2.1 MÚSCULO DELTOIDES

Como hemos dicho anteriormente, este músculo presenta un indudable interés dada su posición en el organismo, que le confiere la posibilidad de participar en diferentes funciones, es decir, tanto esqueléticas como ventilatorias accesorias. Probablemente sus hallazgos estructurales y metabólicos deriven de esta pluripotencialidad, pudiendo además aportar nuevos datos sobre los mecanismos fisiopatológicos que participan en la disfunción muscular en la EPOC.

En nuestro trabajo hemos observado que los pacientes con EPOC (sobre todo a medida que avanza la enfermedad) tienen una fuerte tendencia a presentar un porcentaje de fibras tipo I (expresando MyHC I) menor que los sujetos control. Sin embargo este hallazgo no se confirma con la tipificación por ATPasas, lo que probablemente guarde relación con los distintos factores reguladores en cada caso (mecánico en el caso de la expresión de MyHC y de microambiente tisular en el caso de la actividad enzimática fibrilar). El tamaño fibrilar también tiende a ser inferior en los pacientes con EPOC, tanto a nivel global como si se produce el análisis por tipos celulares. En el mismo sentido se encuentran las relaciones observadas entre tamaño fibrilar del deltoides y gravedad de la enfermedad. Todo ello parece apuntar a que el factor fisiopatológico fundamental en el fenotipo fibrilar del deltoides sea el de la miopatía sistémica, que sería proporcional a la enfermedad. El eventual reclutamiento del deltoides bajo cargas demostrado por nuestro grupo en un trabajo precedente (Méndez¹⁶⁸) tendría un papel menor, pues no conseguiría preservar totalmente las características estructurales de las fibras del músculo. En un trabajo reciente, con análisis de los histogramas de frecuencias de tamaño fibrilar, hemos demostrado que lo que ocurre en realidad es la coexistencia de cambios "duals". Es decir, un grupo de fibras se ha hecho menor de lo normal (probablemente por los factores deletéreos mencionados), mientras que otro grupo se ha hecho mayor (probablemente por un "efecto entrenamiento", relacionado con las cargas respiratorias) (Hernández¹⁶⁹).

En estudios realizados en otros grupos musculares, como el cuádriceps, se ha observado que pacientes con EPOC grave presentaban una disminución en el porcentaje de MyCH I, que se correlacionaba con el grado de obstrucción (Maltais¹⁰⁴). Sin embargo, otros

autores como Satta¹⁰³, estudiando un grupo de pacientes con enfermedad moderada, no han hallado cambios en la expresión de MyCH I en relación a sujetos sanos. Probablemente en este caso se implicaría el grado de actividad mecánica ventilatoria del deltoides en ambos grupos, dado que la activación muscular es uno de estímulos más potentes en la expresión de los genes de miosina. A nivel del bíceps se ha descrito también la aparición de atrofia en las fibras tipo I y tipo II en relación a la pérdida ponderal y al grado de obstrucción (Sato¹⁰⁷). Esto podría estar en relación con los efectos sistémicos de la enfermedad respiratoria.

En vista de estos datos se podría hipotetizar que si bien existen factores sistémicos implicados en la disfunción muscular, la respuesta varía dependiendo del grupo muscular analizado y aún en el mismo músculo, con presencia de cambios heterogéneos.

Al analizar la actividad enzimática oxidativa muscular global, a través de la capacidad de la enzima CS, pudo observarse que ésta era superior en los pacientes con EPOC, correlacionándose además directamente con el grado de obstrucción. Es decir, a mayor grado de enfermedad mayor incremento en la actividad de la CS. Este resultado podría estar en relación con el reclutamiento antes mencionado del deltoides bajo cargas mecánicas e implicaría un efecto "entrenamiento". Un punto de interés es el por qué este efecto se ha expresado en cambios de tipo aerobio en la actividad enzimática y contrarios en el fenotipo fibrilar, al menos en el tamaño y expresión de proteínas estructurales. Aunque meramente especulativa, nuestra explicación es nuevamente que esto se debe a los diferentes mecanismos de regulación de unos y otros. Así, las características fibrilares dependen fundamentalmente del tipo e intensidad de la actividad mecánica, mientras que la regulación de la cantidad de enzima y su capacidad intrínseca dependen más de factores de microambiente celular. Algo parecido sucedería con la actividad de la otra enzima oxidativa analizada, la ATPasa, que concuerda en su tendencia con el incremento observado en la capacidad de la CS (Gea¹³¹).

En cuanto a la actividad glicolítica, no se encontraron diferencias entre la actividad de la PFK entre los pacientes con EPOC y los sujetos controles. Sin embargo, la actividad de la LDH se hallaba incrementada en los primeros, lo que podría nuevamente facilitar el paso de sustrato a la vía oxidativa en condiciones apropiadas. Por su parte, no se observaron cambios en la capacidad enzimática ligada a la reserva energética (CPK).

En estudios previos a nivel de los músculos de las extremidades inferiores (cuádriceps) se ha observado que los pacientes con EPOC presentan un nivel de actividad de la PFK superior a los sujetos controles. Esto se podría explicar por el efecto de la hipoxia crónica y el incremento de la capacidad de metabolismo anaeróbico (Jakobsson¹⁰⁶). Asimismo, una enzima que interviene en el transporte electrónico y por tanto en el metabolismo aeróbico, la COX, y que aumenta en situaciones de hipoxia, también parece estar incrementada en los pacientes con EPOC, sobre todo si presentan insuficiencia respiratoria (Sauleda¹³⁰). Sin embargo, en otros estudios se ha observado que la capacidad oxidativa muscular, valorada por la actividad de la CS, estaba disminuida en los cuádriceps de los pacientes con EPOC (Maltais¹²¹). Esto probablemente estaría en relación con mecanismos de regulación diferentes o por la influencia de factores sistémicos que alterarían la relación normal entre ambas vías (Sauleda¹³⁰).

Por último, la densidad capilar en el deltoides de los pacientes con EPOC tiende a ser menor que en sujetos sanos, aunque no alcanza la significación estadística. Como ya se ha mencionado anteriormente, el número de capilares es un factor que intervendría potencialmente en la capacidad oxidativa muscular dado que facilitaría un correcto aporte de oxígeno. Nuevamente, la disparidad en los mecanismos reguladores provocaría que el predominante en este caso fuera el de la miopatía periférica, o el relativo decondicionamiento, al ser los hallazgos de nuestro trabajo muy similares a los observables en el cuádriceps de pacientes con EPOC.

En resumen, el deltoides muestra cambios en los pacientes con EPOC que sugieren una facilitación del metabolismo aeróbico a medida que avanza la enfermedad. Estos cambios son especialmente evidentes a nivel enzimático y difieren de lo observado en los músculos de las extremidades inferiores. Sin embargo y como se ve en el apartado siguiente, son de menos magnitud que los observados en los músculos específicamente ventilatorios. Por el contrario, los capilares disminuyen de forma similar a lo previamente descrito en otros músculos periféricos.

11.3 CAPACIDAD OXIDATIVA EN LOS TRES MÚSCULOS ANALIZADOS

En individuos sin patología obstructiva y en pacientes con EPOC considerados globalmente la capacidad oxidativa del diafragma e intercostal es superior a la del deltoides. La explicación, como se ha mencionado anteriormente, podría ser la carga crónica derivada de la actividad respiratoria, respectivamente normal o aumentada por la obstrucción de las vías áreas, que ejercería un "efecto entrenamiento" sobre los músculos respiratorios.

Sin embargo en los pacientes más graves, se observaría una tendencia a desarrollar una mayor capacidad enzimática oxidativa en el diafragma que en el intercostal, aunque los componentes puramente estructurales se mantendrían similares en ambos músculos respiratorios.

11.4 COMPARACIÓN DE LOS DOS MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN DE FIBRAS OXIDATIVAS

En este trabajo hemos analizado el porcentaje de fibras de tipo I mediante dos técnicas complementarias, una de base estructural y la otra de fundamento metabólico. El porcentaje de fibras tipo I por ambas técnicas es muy similar al analizar el diafragma. En el caso del intercostal las fibras tipo I tienden a estar discretamente infraestimadas por la técnica metabólica respecto de la estructural. La discrepancia mayor ha aparecido en el músculo deltoides en el grupo de pacientes con EPOC, donde ambos métodos difieren de forma significativa. En concreto, "sobreestimando" el método enzimático el componente de potencial oxidativo respecto del estructural. Esta situación no se produce en la población con función pulmonar normal.

Nuestra explicación, previamente mencionada al hablar específicamente del deltoides, se hallaría ligada a los elementos reguladores en cada caso y ligados a la enfermedad (ausentes en el sujeto sano). Estos son de tipo fundamentalmente mecánico en la expresión de las isoformas de las proteínas estructurales, y de índole predominantemente de microambiente hístico en el caso de las actividades enzimáticas. En este sentido cabe recordar que la actividad ATPasa tiene un comportamiento paralelo al de la otra enzima oxidativa analizada (CS).

CONCLUSIONES

12 CONCLUSIONES

1. Los diferentes factores, estructurales y metabólicos, que contribuyen a la capacidad oxidativa se **adaptan de forma heterogénea** en diversos músculos de los pacientes con EPOC. Esto es probablemente atribuible a los distintos elementos reguladores en cada caso (fundamentalmente actividad mecánica, acción local de diversas hormonas y factores de crecimiento, así como microambiente hístico).

2. Esta adaptación varía además dependiendo del músculo analizado, lo que sugiere que se haya influenciado no sólo por factores sistémicos relacionados con la EPOC (mediadores, inflamación, estrés oxidativo, etc) sino también por elementos locales (sobrecarga crónica, desuso):
 - a) El diafragma tendería a preservar su actividad oxidativa mediante el mantenimiento o discreto incremento de sus elementos estructurales y enzimáticos.

El componente con mayor afectación para facilitar la capacidad oxidativa parece ser el incremento de la densidad capilar, y el "más limitante" la actividad enzimática global.
 - b) El intercostal externo mostraría cambios estructurales y metabólicos divergentes, unos relacionados con actividad anaeróbica de "fuerza", y otros que también facilitarían actividades sostenidas de tipo aeróbico.

Sus cambios son, por tanto, diferenciados de los del diafragma, aunque puedan coincidir en algún elemento.
 - c) En pacientes con enfermedad grave, los elementos enzimáticos parecen dotar de mayor capacidad oxidativa al diafragma que al intercostal, siendo más similares en ambos músculos los de tipo estructural.

- d) Los cambios observados en el deltoides difieren de los descritos previamente por otros autores a nivel de los músculos periféricos de las extremidades inferiores (fundamentalmente en el cuádriceps).
3. El análisis de los porcentajes fibrilares por la técnica inmunohistoquímica o mediante la tinción de ATPasa muestra pequeñas diferencias, sobre todo en los pacientes con EPOC. Esto probablemente guarde también relación con los diferentes mecanismos reguladores en cada caso.