

**Caracterización del fenotipo muscular  
en la EPOC y sepsis en pacientes:  
Estructura fibrilar, Inflamación,  
Estrés oxidativo y Regeneración.**

Sergi Pascual Guàrdia

TESI DOCTORAL UPF / 2015

**Directors de la Tesi:**

Dr Joaquim Gea Guiral  
Dra Esther Barreiro Portela

Departament de Ciències Experimentals i de la Salut



**Lurdes i Enric**  
**David i Àlex**  
**Judith, Berta i Jordi**

## Agraïments

Si llegiu aquestes línies és perquè d'una manera o d'una altra heu format part d'aquest treball. Potser heu participat activament en algú dels articles que es presenten, potser hem treballat plegats en algú lloc o en algú moment, o potser simplement m'heu aturat i us heu interessat per com m'anava "la Tesi". A tots us estic sincerament molt agraït. Em sento profundament afortunat d'estar on estic, envoltat de companys, amics i familiars que dia rera dia compartim moments i aprenem plegats. Per la vostra atenció, les oportunitats, l'ensenyament, els consells i perquè m'heu fet sentir estimat arreu, aquesta Tesi és també vostra i per vosaltres.

**Quim, Esther, Lurdes, Enric, David, Àlex, Judith, Berta, Jordi, Aurora, Xavier, Joan, Victor, Carles, Mauricio, Miquel, Eva, Carme, Roser, Toni, Marisol, Cristina, Núria, Albert, Juana, Pilar, Jacobo, Diego, Laia, Anna, Mohammed, Roberto, Diana, Gabriela, Clara, Elena, Jose, Susanna, Mireia, Alba, Àngela, Mercè, Laura, Ana, Isabel.**

## Índice

15	Resumen
17	Resum
19	<i>Abstract</i>
21	Nota preliminar
	<ul style="list-style-type: none"><li>• Colaboraciones</li><li>• Publicaciones adicionales</li><li>• Comunicaciones relacionadas con la Tesis Doctoral</li><li>• Financiación</li></ul>
27	Abreviaturas
31	<b>1. Introducción</b>
33	1.1. La inflamación
34	1.1.1. Células del sistema inmune
	<ul style="list-style-type: none"><li>a) Linfocitos T</li><li>b) Linfocitos B</li><li>c) Linfocitos <i>Natural-Killer</i> (NK)</li><li>d) Macrófagos</li><li>e) Polimorfonucleares</li></ul>
37	1.1.2. Citoquinas proinflamatorias
	<ul style="list-style-type: none"><li>a) Factor de Necrosis Tumoral <math>\alpha</math> (TNF-<math>\alpha</math>)</li><li>b) Interleuquina 1</li><li>c) Interleuquina 6</li></ul>

40	1.2. El Estrés Oxidativo y el Nitrosativo	67	<b>3. Métodos. Aspectos generales</b>
40	1.2.1. Estrés Oxidativo	69	3.1. Población
40	1.2.2. Estrés Nitrosativo	69	3.2. Evaluación clínica y funcional
41	1.3. El Músculo Estriado	69	3.3. Biopsias musculares
41	1.3.1. Estructura	70	3.4. Estudios de histología y biología molecular
43	1.3.2. Función muscular	73	3.5. Cultivos celulares de Mioblastos
44	1.3.3. Disfunción muscular	74	3.6. Métodos estadísticos
45	1.3.4. Fisiopatología de la disfunción muscular	77	<b>4. Resultados</b>
46	1.3.4.1. Factores y mecanismos moleculares mecánicos	81	4.1. Estudio 1: Mejoría de la calidad de vida y capacidad de ejercicio sin cambios en la biología muscular tras entrenamiento general de pacientes con EPOC grave
46	1.3.4.2. Factores y mecanismos metabólicos-estructurales		• Hipótesis del Estudio 1
48	1.3.5. Reparación/regeneración muscular		• Objetivo del Estudio 1
51	1.4. Modelo clínico de inflamación crónica de baja intensidad: La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)		• Addenda al Estudio 1
51	1.4.1. La Inflamación y el Estrés Oxidativo y Nitrosativo en la EPOC	91	4.2. Estudio 2: <i>Vastus Lateralis Fiber Shift Is an Independent Predictor of Mortality in Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i>
52	1.4.2. Disfunción muscular en la EPOC		• Hipótesis del Estudio 2
53	1.4.2.1. Disfunción de los músculos respiratorios en la EPOC		• Objetivo del Estudio 2
54	1.4.2.2. Disfunción de los músculos periféricos en la EPOC	95	4.3. Estudio 3: Alteraciones de la regeneración en el músculo cuádriceps de pacientes con EPOC y masa muscular reducida: ¿Consecuencia del microambiente celular?
55	1.4.3. Reparación/regeneración muscular en la EPOC		• Hipótesis del Estudio 3
56	1.4.4. Calidad de vida relacionada con la Salud en la EPOC		• Objetivo del Estudio 3
57	1.4.5. Mortalidad en la EPOC	107	4.4. Estudio 4: Inflamación y Estrés Oxidativo en los músculos respiratorios y periféricos de pacientes con sepsis grave
58	1.4.6. Rehabilitación en la EPOC		• Hipótesis del Estudio 4
59	1.5. Modelo clínico de inflamación aguda de elevada intensidad: La Sepsis		• Objetivo del Estudio 4
59	1.5.1. La Inflamación y el Estrés Oxidativo y Nitrosativo en la Sepsis		
60	1.5.2. Disfunción muscular en la Sepsis	115	4.5. Resumen de resultados
63	<b>2. Hipótesis general</b>		• EPOC - Inflamación crónica de baja intensidad
			• Sepsis - Inflamación aguda de elevada intensidad

119	<b>5. Discusión</b>
121	5.1. Aportaciones
123	5.2. Relevancia de este tipo de estudios
123	5.3. La EPOC, una inflamación crónica de baja intensidad
126	5.4. SEPSIS - Inflamación aguda de elevada intensidad
129	<b>6. Conclusiones</b>
133	<b>7. Perspectivas de futuro</b>
137	<b>8. Bibliografía</b>
163	<b>9. Addendum</b>
	Artículo de revisión: <i>Muscle dysfunction in COPD: Update on causes and biological findings</i>

## Resumen

La inflamación y el estrés oxidativo son mecanismos moleculares que contribuyen al daño y a la disfunción muscular. Existen procesos crónicos con fenómenos inflamatorios de bajo grado pero de larga duración (EPOC, con o sin pérdida de peso), así como situaciones clínicas con liberación aguda de gran cantidad de moléculas proinflamatorias (Sepsis). Los mecanismos de regeneración del músculo en ambas entidades son esenciales para la correcta recuperación funcional y pueden condicionar cambios fenotípicos. **Objetivo:** En la EPOC, evaluar el estrés oxidativo, inflamación y estructura antes y después de un programa de rehabilitación en el vasto lateral (VL) del cuádriceps e intercostal. En dos grupos adicionales estudiar cambios regenerativos en el VL y realizar un análisis de cambios fibrilares y supervivencia. En pacientes con sepsis, investigar los eventos de estrés oxidativo e inflamación en los mismos músculos. **Métodos:** Estudio 1: Se analizaron cambios fibrilares (inmunohistoquímica) y estrés oxidativo (*western-blot*) en el músculo VL e intercostal en 25 pacientes con EPOC, antes y después de un entrenamiento de alta intensidad (8-10 semanas). En todos los pacientes se determinaron la capacidad de ejercicio (test de marcha de 6' y cicloergómetro) y calidad de vida relacionada con la salud (cuestionarios SGRQ y SF36). Estudio 2: En un grupo adicional de 392 pacientes EPOC se analizó el fenotipo fibrilar del VL y su supervivencia. Estudio 3: Se obtuvieron muestras del VL en 15 pacientes con EPOC sin bajo peso, 15 pacientes EPOC con bajo peso y 10 sujetos control. Se analizaron cambios fibrilares, daño y número de células satélite (inmunohistoquímica), expresión de ARN de genes clave en la regeneración, mediadores de inflamación y mantenimiento de la masa muscular (PCR *en tiempo real*), y niveles de proteínas clave relacionadas con la regeneración (*western-blot*). Se obtuvieron cultivos primarios de mioblastos de dichas muestras musculares, en las que se evaluaron propiedades de migración (microscopía de tracción), capacidad de proliferación (*Population doubling time* y ELISA) y diferenciación (ELISA y PCR *en tiempo real*). Estudio 4: En el VL e intercostal de 6 pacientes con sepsis grave y 6 sujetos control se analizó la estructura muscular, células inflamatorias, estrés oxidativo y expresión de mediadores inflamatorios (técnicas mencionadas anteriormente). **Resultados:** Estudio 1: Situación basal, en el VL respecto del intercostal se observaron niveles de estrés oxidativo y antioxidantes (SOD2) aumentados. Tras 10 semanas de entrenamiento, se observaron mejorías en la capacidad de ejercicio y calidad de vida sin aumentos en los niveles de estrés oxidativo en ninguno de los músculos. Estudio 2: En el VL de pacientes EPOC el aumento en la proporción de fibras rápidas se asoció a una mayor mortalidad, especialmente en aquellos con enfermedad grave. Estudio 3: En el VL de pacientes EPOC respecto de los sujetos control se observó mayor limitación al ejercicio, aumento de fibras

rápidas, signos de daño, núcleos internalizados y células satélite. En los mismos pacientes se observó un incremento en la expresión de genes involucrados en fases precoces de la regeneración muscular (PAX7, MYOG y MYF6), pero descenso en los que regulan fases tardías (MYH8). Además en los pacientes con bajo peso se observó un aumento en los niveles de IL-6 y una sobreexpresión en la expresión de IGF-1 y MGF en el VL. En los cultivos primarios de mioblastos no se observaron diferencias entre pacientes y controles en la capacidad de migración, proliferación, diferenciación ni en la expresión de genes clave de regeneración muscular. **Estudio 4:** En el VL de pacientes con sepsis los niveles de diversos marcadores de estrés oxidativo e inflamación (TNF-alfa y sus receptores, IL-1 $\beta$ , IL-6 y CD18) estaban aumentados, mientras que no se observaron diferencias en el músculo intercostal. **Conclusiones:** Se han encontrado alteraciones musculares en la EPOC y la sepsis, aunque con un patrón diferenciado entre la musculatura respiratoria y periférica en esta última. El entrenamiento de alta intensidad induce una mejoría clínica en los pacientes EPOC, sin conllevar aumento en los niveles de estrés oxidativo o inflamación. Los mecanismos de regeneración/repación parecen hallarse alterados en el VL de pacientes con EPOC, probablemente debido a la interacción de factores locales *in vivo*. El fenotipo fibrilar en este músculo predice la mortalidad de dichos pacientes.

## Resum

La inflamació i l'estrès oxidatiu són mecanismes moleculars que contribueixen al dany i a la disfunció muscular. Hi ha processos crònics amb fenòmens inflamatoris de baix grau però de llarga durada (MPOC, amb o sense pèrdua de pes), així com situacions clíniques amb alliberament agut de gran quantitat de mol·lècules proinflamatòries (Sèpsia). Els mecanismes de regeneració del múscul en les dues entitats són essencials per a la correcta recuperació funcional i poden condicionar canvis fenotípics. **Objectiu:** En la MPOC, avaluar l'estrès oxidatiu, la inflamació i l'estructura abans i després d'un programa de rehabilitació en el *vastus lateralis* (VL) del quàdriceps i en l'intercostal. En dos grups addicionals de pacients estudiar canvis regeneratius en el VL i realitzar una anàlisi de canvis fibril·lars i supervivència. En pacients amb sèpsia, investigar els esdeveniments d'estrès oxidatiu i la inflamació en els mateixos músculs. **Mètodes:** **Estudi 1:** Es van analitzar els canvis fibril·lars (immunohistoquímica) i l'estrès oxidatiu (*western-blot*) en els músculs VL i intercostal de 25 pacients amb MPOC, abans i després d'un entrenament d'alta intensitat (8-10 setmanes). En tots els pacients es van determinar la capacitat d'exercici (test de marxa de 6' i cicloergòmetre) i la qualitat de vida relacionada amb la salut (qüestionaris SGRQ i SF36). **Estudi 2:** en un grup addicional de 392 pacients MPOC es va analitzar el fenotip fibril·lar del VL i la seva supervivència. **Estudi 3:** Es van obtenir mostres del VL en 15 pacients amb MPOC sense baix pes, 15 pacients MPOC amb baix pes i 10 subjectes control. Es van analitzar els canvis fibril·lars, el dany i el nombre de cèl·lules satèl·lit (immunohistoquímica), l'expressió d'ARN de gens clau en la regeneració, els mediadors d'inflamació i el manteniment de la massa muscular (PCR *en temps real*), i els nivells de proteïnes clau relacionades amb la regeneració (*western-blot*). Es van obtenir cultius primaris de mioblastes d'aquestes mostres musculars, en què es van avaluar les propietats de migració (microscòpia de tracció), la capacitat de proliferació (*Population doubling time* i ELISA) i de diferenciació (ELISA i PCR *en temps real*). **Estudi 4:** Al VL i l'intercostal de 6 pacients amb sèpsia greu i 6 subjectes control es va analitzar l'estructura muscular, les cèl·lules inflamatòries, l'estrès oxidatiu i l'expressió de mediadors inflamatoris (tècniques esmentades anteriorment). **Resultats:** **Estudi 1:** Situació basal, al VL respecte de l'intercostal es van observar nivells d'estrès oxidatiu i antioxidants (SOD2) augmentats. Després de 10 setmanes d'entrenament, es van observar millores en la capacitat d'exercici i la qualitat de vida sense augments en els nivells d'estrès oxidatiu en cap dels músculs. **Estudi 2:** Al VL de pacients MPOC l'augment en la proporció de fibres ràpides es va associar a una major mortalitat, especialment en aquells amb malaltia greu. **Estudi 3:** En el VL de pacients MPOC respecte dels subjectes control es va observar major limitació a



l'exercici, augment de fibres ràpides, de signes de dany, de nuclis internalitzats i de cèl·lules satèl·lit. En els mateixos pacients es va observar un increment en l'expressió de gens involucrats en les fases precoces de la regeneració muscular (PAX7, MYOG i MYF6), però descens en els que regulen les fases tardanes (MYH8). A més en els pacients amb baix pes es va observar un augment en els nivells d'IL-6 i una sobrerregulació en l'expressió d'IGF-1 i MGF al VL. En els cultius primaris de mio blasts no es van observar diferències entre pacients i controls en la capacitat de migració, de proliferació, de diferenciació ni en l'expressió de gens clau de regeneració muscular. **Estudi 4:** Al VL de pacients amb sèpsia els nivells de diversos marcadors d'estrès oxidatiu i d'inflamació (TNF-alfa i els seus receptors, IL-1 $\beta$ , IL-6 i CD18) estaven augmentats, mentre que no es van observar diferències en el múscul intercostal. **Conclusions:** S'han trobat alteracions musculars en la MPOC i en la sèpsia, tot i que amb un patró diferenciat entre la musculatura respiratòria i perifèrica en aquesta última. L'entrenament d'alta intensitat indueix una millora clínica en els pacients MPOC, sense comportar augment en els nivells d'estrès oxidatiu o inflamació. Els mecanismes de regeneració/reparació semblen estar alterats en el VL de pacients amb MPOC, probablement a causa de la interacció de factors locals *in vivo*. El fenotip fibril·lar en aquest múscul prediu la mortalitat d'aquests pacients.

## Abstract

Both inflammation and oxidative stress are molecular mechanisms that contribute to muscle damage and dysfunction. Although different chronic disorders share inflammatory phenomena, some of them are characterized by a low-grade but long duration of these events (COPD, with or without weight loss) and others are more acute with a dramatic release of many proinflammatory molecules (Sepsis). The mechanisms of muscle regeneration in both entities are essential for a proper structural and functional recovery, and can condition phenotypic changes. **Objective:** To assess oxidative stress, inflammation and muscle structure before and after a rehabilitation program in the vastus lateralis (VL) and intercostal muscles of COPD patients. Moreover, to evaluate regenerative changes in the VL and to carry out a survival analysis. In parallel, to investigate the events of oxidative stress and inflammation in the muscles of septic patients. **Methods:** **Study 1:** fiber changes (immunohistochemistry) and oxidative stress (western-blot) were analyzed in the intercostal and VL muscles of 25 COPD patients before and after a high intensity training (8-10 weeks). Exercise capacity (6' walking test and cycloergometry) and health-related quality of life (SGRQ and SF36) were also determined. **Study 2:** fiber phenotype of VL and survival was analyzed in an additional group of 392 COPD patients. **Study 3:** fiber changes, damage and number of satellite cells (immunohistochemistry), RNA expression of key genes involved in regeneration, mediators of inflammation and maintenance of muscle mass (real time PCR), and levels of key proteins related to regeneration (western-blot) were analyzed in the VL of COPD patients (15 underweight and 15 with normal weight) and control subjects (n=10). Primary myoblast cultures of these muscle samples were also performed and cell mechanical properties (linked to migration, tensile microscopy), proliferation (population doubling time and ELISA) and differentiation (ELISA and PCR) were quantified. **Study 4:** samples of intercostal and VL of 6 patients with severe sepsis and 6 control subjects were analyzed for muscle structure, oxidative stress and inflammatory mediators (above mentioned techniques). **Results:** **Study 1:** Basal levels of oxidative stress and antioxidants (SOD2) were increased in the VL versus the intercostal muscle of COPD patients. After 10 weeks of training, significant improvements were observed in exercise capacity and quality of life with no increases in oxidative stress in either of the two muscles. **Study 2:** The increase in the proportion of fast fibers in the VL of COPD patients was associated with increased mortality, especially in those with a severe disease. **Study 3:** Exercise limitation as well as increases in the percentage of fast fibers, signs of muscle damage, internalized nuclei and satellite cells was observed in the VL of COPD patients compared to controls. Furthermore, increased expression of genes involved in early stages of muscle regeneration (PAX7, MYOG

and Myf6) but a decrease in those regulating late phases (MYH8) was also observed in the muscle of COPD patients when compared to controls. Patients with COPD and low weight also showed upregulation of the genes encoding IL-6 and muscle growth factors (IGF-1 and MGF). We saw no difference on primary myoblast cultures in either the ability of migration, proliferation, differentiation or the expression of key muscle regeneration genes between patients and controls. Study 4: Different oxidative stress and inflammatory (TNF- and its receptors, IL-1 $\beta$ , IL-6 and CD18) markers were increased in the VL of septic patients compared with controls, with no differences in the intercostal muscle. **Conclusions:** We found significant alterations in the muscles of both COPD and septic patients, although the latter had a distinct pattern between respiratory and peripheral muscles. High intensity training induces clinical improvement in COPD patients, with no increases in the levels of oxidative stress and inflammation. The mechanisms of muscle regeneration appear to be altered in the VL of COPD patients, which is probably due to the interaction of local factors *in vivo*. Muscle fiber phenotype predicts mortality of these patients.

## Nota preliminar

### Colaboraciones

Todos los estudios que conforman esta tesis doctoral se han realizado en colaboración con otros grupos de investigación de ámbito nacional e internacional.

El primer estudio titulado “Mejoría de la calidad de vida y capacidad de ejercicio sin cambios en la biología muscular tras entrenamiento general de pacientes con EPOC grave”, publicado en la revista *Medicina Clínica*, se realizó en colaboración con los equipos de los doctores Pawel Sliwinski (*Department of Respiratory Medicine, Institute of Tuberculosis and Lung Diseases* de Varsovia, Polonia) y Juan B Galdiz (Departamento de Neumología, Hospital Universitario de Cruces, Bilbao).

El segundo estudio, titulado “*Vastus Lateralis Fiber Shift Is an Independent Predictor of Mortality in Chronic Obstructive Pulmonary Disease*”, fue publicado finalmente como Carta al Editor en la revista *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, y se realizó en colaboración con los equipos de los doctores M.I. Polkey (*Respiratory Biomedical Research Unit, Royal Brompton Hospital* de Londres, Inglaterra), F. Maltais (*Institut Universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, Université Laval* de Quebec, Canadá) y I. Vogiatzis (*Department of Respiratory Medicine, National & Kapodistrian University of Athens*, Grecia).

El tercer estudio titulado “Alteraciones de la regeneración en el músculo cuádriceps de pacientes con EPOC y masa muscular reducida: ¿Consecuencia del microambiente celular?”, actualmente en proceso de *peer review* para su posible publicación, se ha realizado en colaboración con los equipos de los doctores X. Trepal, D. Navajas y R. Farré (*Unitat de Física & Bioenginyeria. IBEC – UB*, de Barcelona).

El cuarto estudio titulado “Inflamación y Estrés Oxidativo en los músculos respiratorios y periféricos de pacientes con sepsis grave”, fue publicado como original en la revista *Medicina Clínica* y se realizó en colaboración con el equipo de la Dra F. Árbol (Unidad de Cuidados intensivos, Hospital de Nuestra Señora del Prado, Talavera de la Reina).

## Publicaciones Adicionales

Durante los años de realización de la presente Tesis doctoral, he tenido la oportunidad de participar en otros estudios relacionados con ella. Aunque finalmente no forman parte del cuerpo de la Tesis, mayoritariamente giran en torno a la disfunción muscular en el paciente con EPOC o en la valoración de la microcirculación del músculo en el paciente con sepsis.

También he tenido la oportunidad de formar parte del Grupo AUDIPOC (auditoría nacional y europea del manejo de los pacientes con EPOC durante un ingreso hospitalario) y en el estudio Biomepoc (determinación de biomarcadores de rasgos fenotípicos en dicha enfermedad). De estos estudios se derivan las siguientes publicaciones:

- 1 Marin J, Fontes CC, **Pascual-Guardia S**, Sánchez F, Oliván M, Argilés JM, Busquets S, López-Soriano FJ, Barreiro E. Redox balance and carbonylated proteins in limb and heart muscles of cachectic rats. *Antioxid Redox Signal*. 2010;12:365-380.
  - 2 Gea J, Casadevall C, **Pascual-Guardia S**, Orozco-Levi M, Barreiro E. Respiratory diseases and muscle dysfunction. *Expert Rev Respir Med*. 2012;6:75-90.
  - 3 Antonio Sancho-Muñoz, Carlos Trampal, **Sergi Pascual**, Juana Martínez-Llorens, Roberto Chalela, Joaquim Gea, Mauricio Orozco-Levi. Muscle Glucose Metabolism in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients. *Arch Bronconeumol*. 2014;50:221-7.
  - 4 Rodríguez A, Marín-Corral J, Oliva I, Claverías L, Cos E, Rosich S, Solé C, Bodí M, **Pascual-Guardia S**, Gea J. Regional oxygen saturation index (rSO<sub>2</sub>) in brachioradialis and deltoid muscle. Correlation and prognosis in patients with respiratory sepsis. *Med Intensiva*. 2015;39:68-75.
  - 5 Puig-Vilanova E, Rodríguez D, Lloreta J, Ausin MP, **Pascual-Guardia S**, Broquetas J, Roca J, Gea J, Barreiro E. Oxidative stress, redox signaling pathways, and autophagy in cachectic muscles of male patients with advanced copd and lung cancer. *Free Radical Biology & Medicine*. 2015;79:91-108.
  - 6 **Pascual S**, Feimer J, De Soyza A, Sauleda Roig J, Haughney J, Padullés L, Seoane B, Reveda L, Ribera A, Chrystyn H. Preference, satisfaction and critical errors with Genuair and Breezhaler inhalers in patients with COPD: a randomised, cross-over, multicentre study. *NPJ Prim Care Respir Med*. 2015; 25:15018.
  - 7 Marin-Corral J, Claverias L, Bodí M, **Pascual-Guardia S**, Dubin A, Gea J, Rodríguez A. Prognostic value of brachioradialis muscle oxygen saturation index and vascular occlusion test in septic shock patients. *Medicina Intensiva*. 2015. [Epub ahead of print].
  - 8 Rodríguez A, Marin-Corral J, Claverias L, Magret M, Trefler S, Bodí M, **Pascual-Guardia S**, Gea J. Prognostic value of muscle regional saturation index (rSO<sub>2</sub>) in severe community-acquires pneumonia (CAP). En revisión. 2015.
- Otros artículos con autoría grupal (S.pascual es miembro del grupo AUDIPOC):
- 9 Pozo-Rodríguez F, Alvarez CJ, Castro-Acosta A, Melero Moreno C, Capelastegui A, Esteban C, Hernández Carcereny C, López-Campos JL, Izquierdo Alonso JL, López Quílez A, Aguístí A, por el **Grupo AUDIPOC** España. Clinical audit of patients admitted to hospital in Spain due to exacerbacion of COPD (AUDIPOC Study): method and organisation. *Arch Bronconeumol*. 2010; 46:349-57.
  - 10 Lopez-Campos JL, Pozo-Rodríguez F, **AUDIPOC Study Group**. Quality of care assessment in COPD. AUDIPOC: the Spanish audit experience. *Pneumonol Alergol Pol*. 2012;80:505-8.
  - 11 Pozo-Rodríguez F, López-Campos JL, Alvarez-Martínez CJ, Castro-Acosta A, Agüero R, Huetto J, Hernández-Hernández J, Barrón M, Abraira V, Forte A, Sanchez Nieto JM, Lopez-Gabaldón E, Cosío BG, Agustí A; **AUDIPOC Study Group**. Clinical audit of COPD patients requiring hospital admissions in Spain: AUDIPOC study. *PLoS One*. 2012;7:e42156.
  - 12 Lopez-Campos JL, Asensio-Cruz MI, Castro-Acosta A, Calero C, Pozo-Rodríguez F; AUDIPOC and the European COPD Audit studies. Results from an audit feedback strategy for chronic obstructive pulmonary disease in-hospital care: a joint analysis from the AUDIPOC and European COPD audit studies. *PLoS One*. 2014;9:e110394.
  - 13 Jose Luis López-Camos, Sylvia Hartl, Francisco Pozo-Rodríguez, C. Michael Roberts and on behalf of the **European COPD Audit team**. Antibiotic Prescription for COPD Exacerbations Admitted to Hospital: European COPD audit. *PLoS One*. 2015; 10:e0124374.

- 14 Pozo-Rodríguez F, Castro-Acosta A, Alvarez CJ, López-Campos JL, Forte A, López-Quilez A, Agustí A, Abraira V; the **AUDIPOC Study Group**. Determinants of between-hospital variations in outcomes for patients admitted with COPD exacerbations: findings from a nationwide clinical audit (AUDIPOC) in Spain. *Int J Clin Pract*. 2015. [Epub ahead of print].

### Comunicaciones relacionadas con la Tesis Doctoral

Los resultados preliminares de las investigaciones incluidas en esta Tesis Doctoral se han presentado previamente en los siguientes congresos de ámbito nacional e internacional:

- 1 **Pascual-Guàrdia S**, Àrbol F, Sánchez E, Mas S, Merlo V, Barreiro E, Gea J. Estrés oxidativo en los músculos respiratorios y periféricos de pacientes con sepsis. *Arch Bronconeumol* 2008; 44 (extraordinario 1):183.
- 2 **Pascual-Guàrdia S**, Àrbol F, Sánchez E, Mas S, Merlo V, Barreiro E, Gea J. Estrès oxidatiu en els músculs ventilatoris de pacients amb sèpsia. *Ann Med (Barcelona)* 2008; 91 (suppl 4):S4-35.
- 3 **Pascual-Guàrdia S**, Àrbol F, Sánchez E, Mas S, Merlo V, Barreiro E, Gea J. *Estrès oxidatiu en els músculs ventilatoris de pacients amb sepsia..* las Jornadas de Formación del CIBER de Enfermedades Respiratorias. Bunyola (Mallorca). Junio 2008. Sin libro de comunicaciones.
- 4 Casadevall C, **Pascual-Guàrdia S**, Ausín P, Martínez-Llorens JM, Orozco-Levi M, Barreiro E, Gea J. Efectos ambivalentes del bloqueo de los receptores de TNF-alfa en los mioblastos procedentes del cuádriceps de pacientes con EPOC. XII Symposium EPOC Josep Morera. Barcelona 2010. Sin libro de comunicaciones.
- 5 Casadevall C, **Pascual-Guàrdia S**, Ausin P, Martínez-Llorens JM, Orozco-Levi M, Barreiro E, Gea J. La inactivación funcional de los receptores de TNF-alfa afecta al proceso de regeneración de mioblastos procedentes del cuádriceps de pacientes con EPOC. *Arch Bronconeumol* 2010; 46 (suppl congreso):113-114.
- 6 Casadevall C, **Pascual-Guàrdia S**, Martínez-Llorens JM, Ausín P, Orozco-Levi M, Barreiro E, Gea J. *Ambivalent effects of TNF- in myogenic cells from the quadriceps muscle of COPD patients*. *Eur Respir J* 2010; 36 (suppl):610s.
- 7 García S, Casadevall C, Gea J, **Pascual-Guàrdia S**, Navajas D, Trepát X. *Immobilized chemoattractant gradients to study mechanics and migration of satellite cells*. 3rd IBEC Symposium on Bioengineering and Nanomedicine. Sin libro de comunicaciones.
- 8 **Pascual-Guàrdia S**, Casadevall C, Martínez-Llorens JM, Ausín P, Orozco-Llevi M, Barreiro E, Gea J. *Functional blockade of TNF-alpha and myogenic differentiation in cells from peripheral muscles of COPD patients*. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183 (electronic suppl):A4264.
- 9 Casadevall C, **Pascual-Guàrdia S**, Ausín P, Martínez-Llorens JM, Orozco-Levi M, Barreiro E, Gea J. La inactivación funcional de los receptores de TNF-alfa afecta al proceso de regeneración de mioblastos procedentes del cuádriceps de pacientes con EPOC. 3eras Jornadas de Formación CIBER de Enfermedades Respiratorias. Bunyola (Mallorca), 2011. Sin libro de comunicaciones.
- 10 Casadevall C, **Pascual-Guàrdia S**, Ausín P, Martínez-Llorens J, Domínguez-Álvarez M, Barreiro E, Gea J. Señalización alterada en los miocitos de pacientes con EPOC y bajo peso. XIII Symposium EPOC Josep Morera. Barcelona 2012. Sin libro de comunicaciones.
- 11 **Pascual-Guàrdia S**, Casadevall C, Martínez-Llorens JM, Lloreta J, Orozco-Levi M, Barreiro E, Gea J. Lesión y reparación en los músculos respiratorios de pacientes con EPOC grave. *Arch Bronconeumol* 2013; 49 (supl congreso):106.
- 12 **Pascual-Guàrdia S**, Casadevall C, Aguiló R, Rodríguez A, Belda J, Gómez-Caro A, Martínez-Llorens JM, Ausín P, Barreiro E, Gea J. Lesión y capacidad funcional de las Células Satélite de diafragma y cuádriceps procedentes de pacientes con EPOC grave. Resultados preliminares. *Arch Bronconeumol* 2013; 49 (supl congreso):106.
- 13 **Pascual-Guàrdia S**, Casadevall C, Martínez-Llorens JM, Ausín P, Barreiro E, Gea J. *Myocytes collected from COPD patients with cachexia preserve their myogenic potential*. *Barcelona-Boston Lung Conference*, Barcelona 2013. Sin libro de comunicaciones.
- 14 **Pascual-Guàrdia S**, Casadevall C, Martínez-Llorens JM, Aguiló R, Ausín P, Barreiro E, Gea J. Los mioblastos del músculo cuádriceps de pacientes con EPOC y caquexia mantienen preservado su potencial miogénico. XIV Symposium EPOC Josep Morera. Barcelona 2014. Sin libro de comunicaciones.

- 15 Casadevall C, Pascual-Guàrdia S, Martínez-Lorens JM, Ausín P, Barreiro E, Gea J. *Muscle precursor cells obtained from cachectic COPD patients preserve their myogenic potential in vitro*. Am J Resp Crit Care Med 2014; 189 (Meeting Abstracts): A2059.
- 16 Pascual-Guàrdia S, Casadevall C, Martínez-Llorens MJ, Ausín P, Barreiro E, Gea J. Las células precursoras musculares obtenidas de pacientes con EPOC y caquexia preservan su potencial miogénico *in vitro*. Arch Bronconeumol 2014; 50 (especial congreso):100.
- 17 Casadevall C, Pascual-Guàrdia S, García S, Ausín P, Trepas X, Barreiro E, Gea J. *Impaired myogenesis in the quadriceps muscle of cachectic COPD patients*. Eur Respir J 2014; 44 (suppl) 58:433.

### Financiación

- 1 Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2011- 26908). Papel de TNF- $\alpha$  en la regulación de la capacidad regenerativa muscular de sujetos sanos y de pacientes con EPOC. Inicio: 2011, Fin: 2014. Función: Investigador colaborador.
- 2 Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). Papel de las células satélites en la disfunción muscular en la EPOC. Inicio: 2008, Fin: 2011. Función: Investigador colaborador.
- 3 *Fundació Catalana de Pneumologia* (FUCAP). Papel de las células satélites en la disfunción muscular en la EPOC. Inicio:2008, Fin: 2010. Función: Investigador colaborador.

## Abreviaturas

**ACT $\beta$** : Beta actina  
**ADN**: Ácido desoxiribonucleico  
**ADNc**: ADN complementario  
**ADP**: Adenosina difosfato  
**ARN**: Ácido ribonucleico  
**ARNm**: ARN mensajero  
**ATP**: Adenosina trifosfato  
**ATS**: Del inglés *American Thoracic Society*  
**BODE**: Del inglés *Body mass index, Obstruction, Dyspnea and Exercise*  
**BrdU**: Bromodeoxiuridina  
**Ca<sup>2+</sup>**: Calcio  
**CaO<sub>2</sub>**: Contenido arterial de oxígeno  
**CD**: Del inglés *cluster of differentiation*  
**CdVRS**: Calidad de vida relacionada con la salud  
**CEXS**: *Departament de Ciències Experimentals i de la Salut*  
**CK**: Creatinaquinasa  
**CO<sub>2</sub>**: Dióxido de carbono  
**C<sub>T</sub>**: Del inglés *Thresholdcycle*  
**DL<sub>CO</sub>**: Capacidad de difusión del monóxido de carbono  
**DM**: Del inglés *Differentiation medium*  
**DMEM**: Del inglés *Dulbecco's modified eagle medium*  
**EPOC**: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica  
**ERN**: Especies reactivas del nitrógeno  
**ERO**: Especies reactivas del oxígeno  
**FC**: Frecuencia cardíaca  
**FEV<sub>1</sub>**: Volumen espiratorio máximo en el primer segundo  
**FEV<sub>1</sub>/FVC**: Cociente espirométrico porcentual  
**F<sub>I</sub>O<sub>2</sub>**: Fracción inspiratoria de oxígeno  
**FR**: Frecuencia respiratoria  
**FVC**: Capacidad vital forzada  
**GAPDH**: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa  
**GOLD**: Del Inglés *Global Initiative for Obstructive Lung Disease*  
**H<sup>+</sup>**: Hidrógeno  
**H<sub>2</sub>O**: Agua  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: Peróxido de hidrógeno  
**Hb**: Hemoglobina  
**HNE**: 4-Hidroxinonenal

**HO:** Radical hidroxilo  
**IC:** Del inglés *Inspiratory capacity*  
**IFN:** Interferón  
**IL:** Interleuquina  
**IMC:** Índice de masa corporal  
**IMIM:** *Institut Hospital del Mar d'Investigació Mèdica*  
**iNOS:** Isoforma inducible de la NOS  
**ITGβ-2:** Integrina beta-2  
**L<sub>o</sub>:** Longitud óptima  
**MDA:** Malondialdehído  
**Mg<sup>2+</sup>:** Magnesio  
**Mn-SOD:** Manganeseo SOD (isoforma mitocondrial)  
**MyHC:** Del inglés *Myosin heavy chain*  
**NK:** Del inglés *Natural killer*  
**nNOS:** Isoforma neuronal de las NOS  
**NO:** Óxido nítrico  
**NOS:** Del inglés *Nitric oxide synthases*  
**NT:** 3-Nitrotirosina  
**O<sub>2</sub>:** Oxígeno molecular  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Anión superóxido  
**OD:** Del inglés *Oxygen delivery*  
**ONOO:** Peroxinitrito  
**PaCO<sub>2</sub>:** Presión parcial de dióxido de carbono en sangre arterial  
**PaO<sub>2</sub>:** Presión parcial de oxígeno en sangre arterial  
**PCr:** Fosfocreatina  
**PCR:** Proteína C Reactiva  
**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa  
**PDT:** Del inglés *Population doubling time*  
**PEM:** Presión espiratoria máxima  
**Pi:** Fósforo  
**PIM:** Presión inspiratoria máxima  
**PM:** Del inglés *Proliferation medium*  
**PMT:** Presión máxima tolerada  
**QT:** Gasto cardíaco  
**SatO<sub>2</sub>:** Saturación de oxígeno  
**SDRA:** Síndrome del distrés respiratorio agudo  
**SGRQ:** Del inglés *Saint George Respiratory Questionnaire*  
**sIL-6R:** Forma soluble del receptor de la IL-6  
**SOD:** Superóxido dismutasa

**TGF:** Del inglés *Transforming growth factor*  
**TLC:** Del inglés *Total lung capacity*  
**T<sub>lim</sub>:** Tiempo límite  
**TLR:** Del inglés *Toll-Like receptor*  
**TNF:** Del inglés *Tumor necrosis factor*  
**UCI:** Unidad de cuidados intensivos  
**UPF:** *Universitat Pompeu Fabra*  
**URMAR:** *Unitat de Recerca en Múscul i Aparell Respiratori*  
**VM:** Ventilación mecánica  
**V<sub>T</sub>:** Volumen corriente, del inglés *Tidal volume*  
**VO<sub>2</sub>:** Consumo de oxígeno



# Introducción

# 1. Introducción

## 1.1. La inflamación

La inflamación es un proceso fisiológico inespecífico mediado por múltiples células y moléculas con el objetivo de defender al organismo, aislando y/o destruyendo a posibles agentes nocivos (noxas), así como de iniciar el proceso de reparación del tejido dañado.

La respuesta inflamatoria se caracteriza por un incremento en la permeabilidad capilar, el acúmulo de líquido y proteínas plasmáticas, y la presencia masiva y activación de células leucocitarias (1).

En ocasiones el tejido dañado se restituye de forma completa, conservando su estructura y función iniciales (restitución *ad integrum*), pero en ocasiones se crea un tejido con nuevas características, lo que se denomina remodelado (Fig.1)

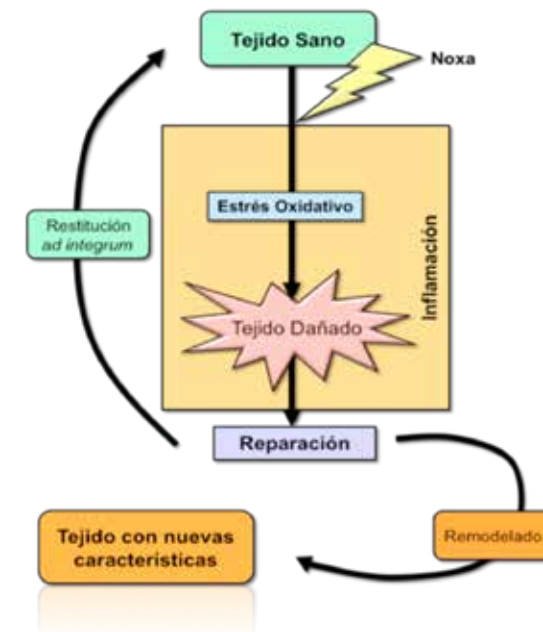


Fig.1. Esquema del proceso de daño y reparación tisular.



Clínicamente la inflamación se ha dividido en dos patrones bien definidos: la inflamación crónica y la inflamación aguda. Ambos tipos presentan una respuesta vascular y celular mediada por múltiples moléculas y factores químicos que se describirán más adelante.

La inflamación aguda presenta un inicio rápido y generalmente es de corta duración (horas o días). Su principal característica es la exudación de líquido y células plasmáticas que generarán edema y migración de leucocitos (principalmente neutrófilos) (2).

La inflamación crónica es de más larga duración (semanas o meses) y se caracteriza por la presencia predominante de linfocitos, macrófagos, proliferación de vasos sanguíneos, así como fibrosis e incluso necrosis tisular.

Por otra parte, en los últimos años se ha postulado un tercer tipo de inflamación que ocurriría en las fases iniciales del proceso o bien en entidades crónicas, y que algunos autores denominan como inflamación de “baja intensidad” (3). En este tipo de inflamación la presencia de células inflamatorias es escasa y el componente vascular inapreciable, existiendo básicamente un incremento en los mediadores químicos.

### 1.1.1 Células del sistema inmune

A modo de breve resumen, puede afirmarse que el sistema inmunitario está formado por un conjunto heterogéneo de células, de las que las más importantes son los leucocitos. Éstos son los encargados de regular la respuesta inflamatoria mediante el reconocimiento, procesamiento y presentación de antígenos extraños a las células efectoras. Una vez reconocido un antígeno e identificados sus determinantes como extraños, el sistema inmunitario puede llevar a cabo dos clases de respuestas: según se trate de la inmunidad de tipo humoral o de la celular.

#### a) Linfocitos T

Los linfocitos T son los responsables fundamentales de la inmunidad celular, constituyendo el 70% del total. Se originan en las células precursoras linfáticas (linaje linfoide), que migran desde la médula ósea hasta el timo y se diferencian allí bajo la influencia de hormonas locales. Se caracterizan entre otros factores, por la existencia de antígenos específicos de superficie o *cluster of differentiation* (CD). En este sentido se considera que uno de los mejores marcadores del linaje T es el CD3.

Cuando el linfocito T se activa se conoce ya como linfocito T citotóxico, y puede reconocer y destruir a las *células diana* (portadoras de antígenos específicos identificables por sus receptores). Estos linfocitos necesitan tener contacto con la membrana de las células que contienen los antígenos extraños para inducirles la activación del programa de muerte celular (apoptosis) (Fig.2).

#### b) Linfocitos B

Son los principales responsables de la inmunidad humoral, ya que son precursores de las células productoras de anticuerpos (células plasmáticas). Constituyen sólo el 10-20 % de los linfocitos periféricos circulantes. La maduración de los linfocitos B ocurre sobre todo en la médula ósea y son células que se caracterizan entre otras, por la presencia de CD19, CD38 y CD40 en su membrana. Cuando se estimulan por un antígeno, proliferan y todo el clon celular descendiente de un linfocito B activado produce inmunoglobulinas con el mismo lugar de combinación antigénica (Fig.2).

#### c) Linfocitos-*Natural Killer* (NK)

Se consideran la primera línea defensiva frente a distintas agresiones. Constituyen aproximadamente el 10% restante de los linfocitos presentes en sangre periférica. Pueden lisar diversas células sin necesidad de sensibilización previa. No existe una proteína de membrana específica para estos linfocitos, aunque en la práctica clínica se detectan habitualmente utilizando el CD16 y/o el CD56.

#### d) Macrófagos

Son células que proceden de los monocitos (linaje mieloide). En condiciones normales se encuentran dispersos de forma difusa por los tejidos mesenquimales o se agrupan en ciertas vísceras (hígado, bazo, ganglios linfáticos y también en los pulmones, etc.). Actúan tanto como filtros de partículas, microorganismos y células envejecidas, procesando y presentando antígenos a los linfocitos T y B. Entre otras propiedades, se caracterizan por expresar en su membrana el CD68 (Fig.2).

#### e) Polimorfonucleares

Los polimorfonucleares son células que, al igual que los macrófagos, proceden del linaje mieloide. Son las células leucocitarias más abundantes en la sangre del ser humano, representando el 60% del total. Su núcleo forma cuatro o cinco lóbulos unidos, y en su mayor parte se denominan neutrófilos. Los gránulos azurófilos

contienen enzimas, como la peroxidasa, fosfatasa ácida y alfa-glucuronidasa. Participan en la eliminación de parásitos de gran tamaño y en la modulación de la respuesta inmune (Fig.2). Pequeños porcentajes de células blancas constituyen los eosinófilos y los basófilos.

Todas las células del linaje mieloide expresan diferentes isoformas de CD45. Por otra parte, todas las células leucocitarias expresan CD18 por lo que se considera que éste es un excelente marcador panleucocitario.

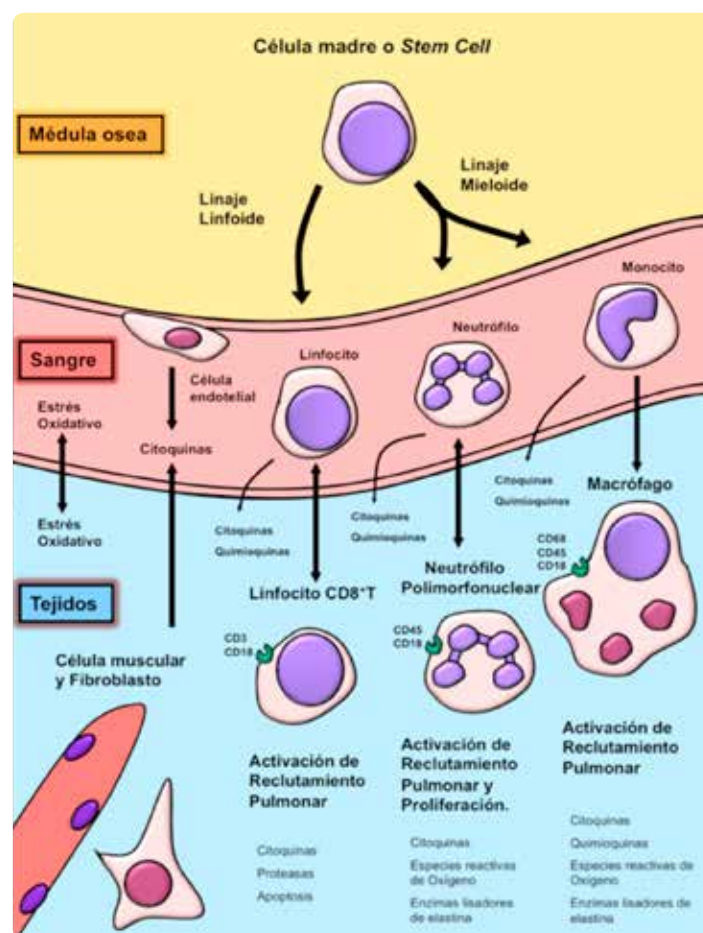


Fig.2. Esquema de las células del sistema inmune y su función.

### 1.1.2 Citoquinas Proinflamatorias

Son proteínas del sistema inmunitario que regulan la función tanto de las células que las producen como de otros tipos celulares. Las citoquinas son agentes responsables de la comunicación intercelular, inducen la activación de receptores específicos de membrana, funciones de proliferación y diferenciación celular. Son producidas fundamentalmente por linfocitos y macrófagos activados, siendo las moléculas responsables de la estimulación de la respuesta inmune, tanto humoral como celular (4).

En general se puede afirmar que la respuesta inflamatoria se caracteriza por un aumento de las citoquinas *proinflamatorias* así como de las llamadas *antiinflamatorias*, cuya función principal es la de limitar la respuesta inflamatoria en los tejidos. El equilibrio entre estos dos tipos de citoquinas es el que determinará el estado inflamatorio de un tejido (Tabla.1).

Principales Citoquinas Proinflamatorias	Principales Citoquinas Antiinflamatorias
TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- $\gamma$	IL-4, IL-13, IL-6, IL-1Ra, TGF- $\beta$ , IL-10

Tabla.1. Principales citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias. TNF (Factor de Necrosis Tumoral), IL (Interleuquina), IFN (Interferón), TGF (Factor de Crecimiento Transformante).

En realidad el tema es más complejo pues unas y otras tienen efectos redundantes y pueden actuar como sus opuestas en determinadas circunstancias.

Las citoquinas secretadas por los linfocitos se conocen en general como linfocinas o interleuquinas (IL), ya que son reguladoras de las respuestas de los leucocitos en general. Su principal función es la de asegurar la defensa del huésped mediante la activación y expansión de las células inflamatorias durante la respuesta inmunitaria, así como el control de la destrucción de dichas células cuando ya no son necesarias. Algunas citoquinas proinflamatorias incrementan el catabolismo muscular pero algunas de ellas también participan en la regeneración muscular (5, 6).

a) TNF- $\alpha$ 

El TNF- $\alpha$  es una citoquina descrita en 1975 por Carswell (7), y que es liberada por múltiples células (monocitos, macrófagos, linfocitos, células musculares, etc.). Posee una potente acción proinflamatoria, que está mediada por su interacción con dos tipos de receptores funcionalmente distintos: TNF-R55 y TNF-R75, también llamados R1 y R2, respectivamente).

Muchas de las bioactividades del TNF- $\alpha$  son compartidas con otras citoquinas, particularmente con la IL-1 e IL-6. Estas actúan sobre la función de diversos órganos de forma tanto directa como indirecta, estimulando determinados mediadores secundarios. Entre estos últimos destaca la forma inducible de la Óxido Nítrico Sintetasa (NOSi), que induce un incremento en la síntesis del Óxido Nítrico (NO).

A nivel de la regeneración muscular, se sabe que el TNF- $\alpha$  es capaz de activar la proliferación y diferenciación de las células satélite a través del aumento de nicotiamida n-metiltransferasa (NNMT) (8). Por otra parte algunos autores han observado que el TNF- $\alpha$  inhibe la formación de los miotubos, probablemente a través de la activación de NF- $\kappa$ B y la inhibición de actividad de IGF-1 (9). Contrariamente, en estudios recientes de nuestro grupo todavía no publicados, se ha observado que el bloqueo completo de ambos receptores del TNF- $\alpha$  (TNFR1 y TNFR2) también produce una inhibición del proceso de diferenciación, lo que podría reforzar la idea de que esta molécula es necesaria a bajas dosis para el correcto proceso de regeneración muscular.

## b) Interleuquina-1

La IL-1 es una citoquina proinflamatoria secretada principalmente por los macrófagos, aunque puede ser secretada por múltiples células, entre ellas las fibras musculares. La IL-1 puede ejercer sus efectos sobre casi todos los tipos celulares (10) y su principal función es la de activar a los linfocitos T en respuesta a diferentes antígenos. Por otra parte, la IL-1 promueve la expresión de diferentes citoquinas y factores de crecimiento que generarán un aumento de producción de neutrófilos por parte de la médula ósea. La IL-1 tiene 3 isoformas: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-1RA (cada una de ellas codificada por un gen diferente, pero situados todos ellos en el cromosoma 2). Los receptores de IL-1 (IL-1R) forman parte de la superfamilia IL-1/*Toll-Like* (TLR) (11). La IL-1 se une a dos tipos específicos de receptores de membrana: la unión con el receptor tipo I (IL-1R1) produce un cambio conformacional del mismo, generando la transducción de la señal. Es probablemente el responsable de todos los efectos biológicos de la citoquina (12). En cambio, el receptor tipo II (IL-1R2) es capaz de interactuar con la IL-1, aunque su señal biológica no es bien conocida hasta la fecha (13).

## c) Interleuquina-6

La IL-6 es una citoquina proinflamatoria producida por una gran variedad de tipos celulares, principalmente los macrófagos. Al igual que la IL-1, también puede ser secretada por las células musculares. El receptor de IL-6 (IL-6R) carece de una forma conocida de transducción de señal, por lo que el complejo IL-6/IL-6R debe asociarse a la proteína transmembrana gp130. Este receptor presenta una expresión ubicua en el organismo, aunque altamente regulada. Aún así, todas las células del organismo son capaces de responder a la estimulación de IL-6 gracias a la existencia de la forma soluble del receptor (sIL-6R) (14), lo que potencia la actividad de esta citoquina (15). La IL-6 se ha relacionado con diversas funciones incluyendo la respuesta inmune, lipólisis, producción hepática de reactantes de fase aguda, mediación de la fiebre y proliferación de progenitores hematopoiéticos (16). Además, la IL-6 induce un aumento del metabolismo proteico y estimula el crecimiento de las células T activadas.

Por otra parte la IL-6, conjuntamente con la IL-10 y la IL-1, constituyen potentes inhibidores de la producción de TNF- $\alpha$  por las células mononucleares periféricas, lo que le confiere una capacidad dual con ciertos efectos antiinflamatorios (17). También, la IL-6 es esencial para la proliferación de las células satélite y por tanto, para la reparación muscular (18, 19).

Cabe destacar que la IL-6 puede incrementarse de forma significativa durante el ejercicio (20-23). Inicialmente se creyó que este fenómeno era secundario al daño muscular inducido por la actividad, pero estudios posteriores han demostrado la ausencia de elevación clara de otros marcadores de inflamación o daño muscular durante el ejercicio moderado-ligero (21, 24). El incremento de la IL-6 durante éste dependería sobretodo de su intensidad y duración, de la masa muscular y de la capacidad de resistencia de cada individuo (25, 26).

## 1.2. El estrés oxidativo y el nitrosativo

### 1.2.1. Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo deriva de un fenómeno biológico: el flujo de electrones de una molécula a otra dentro de un mismo sistema. Cuando se produce la presencia de átomos con electrones desapareados y no funcionan adecuadamente los sistemas antioxidantes, los radicales libres reaccionarán indiscriminadamente con otras moléculas. Según la molécula diana, esta reacción a menudo conllevará daño a las estructuras celulares (membranas, ADN,...) y/o inactivación enzimática.

Las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) son moléculas altamente agresivas formadas de manera natural como subproducto del metabolismo del oxígeno. Presentan un electrón desapareado en su último orbital, lo que les confiere una alta inestabilidad y capacidad de reaccionar con múltiples moléculas (27). Una de las principales fuentes de producción de ERO es la cadena mitocondrial de transporte de electrones (28). Por otra parte, las ERO tienen la capacidad de formar aldehídos tóxicos, como por ejemplo, el Malondialdehído (MDA) y el Hidroxinonenal (HNE), al reaccionar con los ácidos poliinsaturados de las membranas celulares. También tienen la capacidad de modificar propiedades bioquímicas de diversas proteínas, induciendo cambios en su susceptibilidad a la degradación y en la actividad de diferentes enzimas (29). La producción excesiva de ERO generada durante un proceso inflamatorio agudo puede sobrepasar a la capacidad antioxidante de un tejido, generando un estado de estrés oxidativo. Las principales ERO son el Anión Superóxido ( $O_2^-$ ), el Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y los Radicales Hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ). Los efectos de las ERO se regulan gracias a un sistema de enzimas antioxidantes (Catalasa, Superóxido Dismutasa, Glutathione,...).

### 1.2.2. Estrés Nitrosativo

El óxido nítrico (NO) es una molécula de pequeño tamaño sintetizada por un grupo de hemoproteínas conocido como NO-Sintetasa (NOS). El NO también posee un electrón desapareado en su último orbital y, por tanto, participa en numerosos procesos biológicos (30). La unión del NO con el anión superóxido da lugar a la formación de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), un potente agente capaz de oxidar directamente a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, modificando su estructura y su función. También se une de forma selectiva con la Tirosina, formando 3-Nitrotirosina (31-33), que es considerada uno de los marcadores biológicos más importantes de la producción de NO y de sus efectos deletéreos a nivel celular (34-36).

Como se ha comentado anteriormente, es habitual la producción de EROS y de NO en diferentes procesos metabólicos. Las EROS tienen también un papel importante en la señalización celular y son necesarias para la producción normal de la contracción muscular (37). El NO, por otra parte, participa en diferentes procesos como neurotransmisor, como regulador de la tensión arterial, en la relajación del músculo liso y en la regulación del sistema inmunológico.

## 1.3. El músculo estriado

### 1.3.1. Estructura

El músculo estriado o esquelético, también denominado “voluntario”, es el mayor componente tisular en el organismo, representando aproximadamente el 40% del peso total en un individuo sano. Está formado fundamentalmente por dos proteínas estructurales: la actina y la miosina. Ambas se organizan formando las sarcómeras (unidades contráctiles), y éstas a su vez se organizan en miofibrillas, que se sitúan paralelamente para formar la fibra muscular. Los haces de fibras constituyen los fascículos musculares, cuyas agrupaciones forman el músculo propiamente dicho. Las fibras musculares son células sincitiales, es decir multinucleadas y posmitóticas, que se disponen en paralelo longitudinalmente, y pueden alcanzar hasta los 50 cm de longitud.

Ya en el siglo XIX se describieron dos tipos de fibras macroscópicamente diferentes y que podían encontrarse formando parte de un mismo músculo. Por un lado, fibras rojas, delgadas y con abundantes gránulos en su interior, y por otra parte, fibras blancas, de mayor tamaño y con menor densidad de gránulos. Las fibras rojas contienen una gran cantidad de mioglobina y se hallan acompañadas de una gran vascularización, lo que justifica su color.

Posteriormente las fibras se clasificaron según su actividad contráctil: las fibras de contracción lenta o *slow-twitch*, con una velocidad de contracción de entre 50 y 80 m/seg y que se estimulan con facilidad, y las fibras de contracción rápida o *fast-twitch*, con una velocidad de contracción entre 70 y 110 m/seg, pero con una estimulación más dificultosa. Estudios posteriores con estimulación repetida a bajas frecuencias concluyeron que éstas no lograban inducir la aparición de fatiga o lo hacían con gran dificultad en las fibras lentas. Cuando estímulos similares se aplicaban a las fibras rápidas se obtenían dos patrones de comportamiento: unas eran relativamente resistentes a la fatiga y otras a desarrollaban con mayor facilidad. Más adelante, el desarrollo de las técnicas bioquímicas e histoquímicas permitió reconocer

los diferentes perfiles de actividad metabólica de las fibras musculares. Con ello apareció una nueva clasificación basada fundamentalmente en la actividad Adenosin Tri-Fosfatasa (ATP-asa). Combinando las diferentes propiedades mencionadas, se acepta que existen:

Fibras de tipo I: Poseen escasa actividad ATP-asa a pH ácido y tienen un metabolismo fundamentalmente oxidativo. Poseen muchas mitocondrias pero poco glucógeno, lo que les permite participar en ejercicios prolongados con moderado consumo energético.

Fibras de tipo II: Con elevada actividad ATP-asa a pH ácido y un metabolismo predominantemente glucolítico. Se trata de fibras que contienen pocas mitocondrias y mucho glucógeno. Por este motivo son poco resistentes a la fatiga pero de contracción muy potente (ejercicios breves pero intensos).

Modificaciones realizadas posteriormente en la alcalinidad del medio de reacción permitieron establecer una subdivisión de las fibras de tipo II en: tipo IIa, con una reacción débil de ATP-asa en cualquier medio ácido (pH 4,2 y 4,6) y que son moderadamente resistentes a la fatiga, y tipo IIb, que experimentan una fuerte reacción ATP-asa en medio ácido (p.e. a pH 4,6) y son fácilmente fatigables.

Finalmente mediante la utilización de anticuerpos específicos para reconocer los distintos tipos de isoformas de la cadena pesada de la miosina (MyHC) se ha abierto paso a la clasificación inmunohistoquímica de las fibras musculares. Así las fibras se pueden clasificar en las que expresan predominantemente MyHC I, IIa, IIb (ausentes en los seres humanos), IIx, MyHC embrionaria y MyHC neonatal. Las MyHC I, IIa y IIx son las que mayoritariamente se expresan en humanos adultos, mientras que las formas embrionaria y perinatal suelen hacerlo en dichos periodos tempranos del desarrollo, o ante la presencia de estrés o lesión muscular en sujetos adultos (38-40). Las fibras que coexpresan más de una isoforma de cadena pesada de miosina se denominan fibras híbridas y en ocasiones estas fibras son clasificadas atendiendo a la miosina predominante. Combinando los diferentes conocimientos estructurales, metabólicos y funcionales, hoy en día se considera que existen tres tipos básicos de fibras: de tipo I, de tipo IIa y de tipo IIb (aunque estas últimas en seres humanos deberían denominarse en realidad IIx).

### 1.3.2. Función muscular

Cuando el potencial de acción llega a la unión neuromuscular se libera acetilcolina. Esto ocasiona un cambio de potencial en la membrana de la fibra muscular, que libera el calcio de las cisternas terminales, provocando a su vez el deslizamiento de las moléculas de miosina sobre las de actina y generando un acortamiento de las sarcómeros y contracción muscular. Se trata, pues, de un proceso activo que requiere de consumo de energía. Ésta es proporcionada por el Adenosin Tri-fosfato (ATP), que se obtiene principalmente del metabolismo oxidativo o aeróbico, más eficiente que el anaeróbico y que por lo tanto permitirá contracciones más duraderas y repetibles.

Se denomina Fuerza a la expresión mecánica de la máxima capacidad contráctil de un músculo. La fuerza se evalúa mediante maniobras que implican un esfuerzo máximo, generalmente de corta duración. El principal determinante de la fuerza es la masa muscular aunque también influyen las características intrínsecas del propio músculo (tipo de fibras, densidad de éstas, etc). La intensidad de la contracción del músculo depende además del número de unidades motoras reclutadas, de la tasa de activación de las mismas y de la relación que existe entre la longitud y tensión de la fibra. Por lo tanto, existe una longitud determinada en la que la respuesta contráctil es óptima ( $L_0$ ).

La fuerza de los músculos respiratorios se evalúa mediante la determinación de la presión que generan con su contracción máxima. Existen varias maniobras que se utilizan para medir la fuerza de estos músculos, siendo las de determinación estática de las presiones en boca las más utilizadas: Presión Inspiratoria Máxima (PIM) y Presión Espiratoria Máxima (PEM). Por otra parte, la fuerza de las extremidades también se puede evaluar, generalmente a través de la contracción isométrica del cuádriceps o la valoración de la fuerza prensil de la mano mediante dinamómetros.

La Resistencia es la capacidad de mantener un esfuerzo submáximo en el tiempo. Se relaciona directamente con la capacidad oxidativa del músculo y dependerá sobre todo del porcentaje de fibras de tipo I (y también, en menor medida de fibras de tipo IIa), del número de capilares y de la actividad enzimática en las vías aeróbicas. La resistencia se evalúa mediante la repetición de esfuerzos contráctiles. Éstos se pueden aplicar de forma incremental o carga constante. Para la valoración de la resistencia de los músculos respiratorios se hace respirar al sujeto contra cargas respiratorias (resistivas o mejor, de tipo umbral), determinándose la carga máxima y/o el tiempo que es capaz de mantenerlas. Pueden obtenerse así la Presión Máxima

Tolerada (PMT) (cargas incrementales) o el Tiempo Limite ( $T_{lim}$ ) (carga constante submáxima). La valoración de la resistencia de los músculos periféricos se realiza mediante un sistema similar, aplicando cargas submáximas y determinando el tiempo de aguante (41). La función muscular periférica también puede aproximarse de forma indirecta con la prueba de marcha de 6 minutos, donde se evalúan los metros recorridos y síntomas experimentados durante 6 minutos, o mediante una prueba de esfuerzo cardiopulmonar en cicloergómetro o *treadmill*.

### 1.3.3. Disfunción muscular

La disfunción muscular es un concepto que engloba aquellas situaciones en las que la función contráctil esta comprometida, ya sea por afectación directa de los músculos o secundariamente a otra enfermedad (39, 42). Cuando existe disfunción de los músculos respiratorios, ésta se podrá presentar con insuficiencia respiratoria hipercápnica o mixta. Por otra parte, la disfunción de los músculos periféricos (con el cuádriceps como máximo exponente) se presentará con limitación funcional a la deambulación y otras actividades de la vida diaria. Ambas situaciones presentan graves implicaciones para los pacientes en términos de calidad de vida, capacidad de ejercicio e incluso morbi-mortalidad (43-45).

Se conoce como fatiga muscular la incapacidad temporal de mantener un determinado esfuerzo, siendo reversible con el reposo. La debilidad muscular por el contrario, es la incapacidad relativamente permanente de mantener un nivel determinado de actividad. Ambos conceptos no son independientes, así un músculo débil generalmente será más fácilmente fatigable (46). En el caso de los músculos respiratorios, ambas situaciones (fatiga y debilidad) pueden comportar fracaso ventilatorio con hipercapnia e hipoxemia. Como se ha mencionado, en el caso de los músculos periféricos generará limitación al esfuerzo y la movilidad se verá reducida.

Por otra parte, es ahora oportuno recordar algunos conceptos utilizados con frecuencia de forma excesivamente libre, que pueden inducir a confusión. Es el caso de Atrofia muscular, Daño muscular y Caquexia.

La atrofia muscular debería hacer referencia estrictamente a la disminución del tamaño de las fibras o de la masa general muscular. Generalmente la atrofia conllevará disfunción muscular con debilidad y fatigabilidad precoz, aunque no siempre. Existen una serie de fenómenos moleculares que conllevarán o potenciarán la disfunción del músculo al generar atrofia del mismo.

El daño muscular es una lesión estructural de la sarcómera, sarcolema u otras estructuras, que también conllevará disfunción. El clásico ejemplo de daño muscular es aquél que se produce tras un ejercicio intenso. Este produce una alteración ultraestructural con disrupción de la membrana basal y de las estructuras contráctiles de las fibras. Si la lesión es importante se genera una degeneración citoplasmática y se inicia un proceso de fagocitosis con infiltración de macrófagos y leucocitos polimorfonucleares. En este proceso se liberan gran cantidad de enzimas, algunas de ellas con efectos líticos sobre proteínas del citoesqueleto (Fosfolipasas, Proteasas, Endonucleasas, Calpaína,...) (47, 48). Al daño puede seguirle fisiológicamente la reparación o regeneración muscular.

La caquexia es un complejo síndrome metabólico y sistémico, relacionado directamente con una enfermedad subyacente, que provoca intensa anorexia, astenia y pérdida de peso. Se caracteriza por una pérdida de masa muscular con o sin disminución del tejido adiposo. Los procesos inflamatorios crónicos, la resistencia a la insulina y el aumento del recambio proteico tisular están frecuentemente asociados a la caquexia (49). Para su diagnóstico se considera como criterio mayor la pérdida de peso superior al 5% en los últimos 12 meses. La disminución de la fuerza muscular, la astenia, la disminución del índice de masa grasa corporal, el aumento de marcadores inflamatorios (p.e. IL-6), la anemia (cifras de hemoglobina <12 g/dl) o la hipoalbuminemia (albúmina < 3,2 g/dl) se consideran criterios menores. Para confirmar la presencia de caquexia es necesario demostrar un criterio mayor asociado al menos a tres criterios menores (50). En la presente tesis doctoral se ha preferido utilizar los términos “bajo peso” y masa muscular reducida, y no el de “caquexia” para ser más estrictos con el significado.

### 1.3.4. Fisiopatología de la disfunción muscular

La disfunción muscular hace referencia a una situación clínica con compromiso de la actividad contráctil y sus derivadas, fuerza, resistencia y fatigabilidad. Existen múltiples factores y mecanismos biológicos que contribuyen a la aparición de disfunción muscular. Entre ellos destacan el decondicionamiento (que actúa sobretudo en los músculos periféricos) o el aumento/disminución de actividad en condiciones adversas (efecto predominante en los músculos respiratorios), la malnutrición, la edad, el sedentarismo, diversas enfermedades (entre ellas la EPOC), procesos sistémicos inflamatorios, tratamientos concomitantes y aspectos genéticos (51). Además, cabe destacar que en muchas ocasiones pueden coexistir diferentes factores y mecanismos de disfunción, lo que agrava el proceso. En general, los factores y los mecanismos moleculares que contribuyen a la disfunción muscular podrían dividirse en 2 grandes grupos: mecánicos y metabólicos-estructurales (46).

### 1.3.4.1. Factores y mecanismos moleculares mecánicos

Las enfermedades que cursan con obstrucción al flujo aéreo y que conllevan un incremento en los volúmenes pulmonares (hiperinsuflación), así como aquellas entidades que se caracterizan por una alteración morfológica de la caja torácica, pueden modificar la longitud del diafragma, alejándolo de la  $L_0$  óptima, y en consecuencia alterar su función. Este incremento en el trabajo ventilatorio puede generar un desequilibrio entre la oferta y la demanda metabólica al músculo, lo que también contribuye a su disfunción. Es infrecuente que en gente sana se produzca este mecanismo de disfunción muscular, reservándose en general a los grupos de pacientes antes referidos. Este apartado se amplía en la sección dedicada a la disfunción muscular en la EPOC.

El decondicionamiento: La falta de ejercicio muscular conlleva atrofia de este tejido, con la consecuente disfunción. En general este fenómeno se objetiva en sujetos con baja actividad física, lo que generalmente se manifiesta en la musculatura de las extremidades inferiores. Sin embargo, no es raro encontrar también decondicionamiento en la musculatura respiratoria, sobretodo en aquellos pacientes sometidos a ventilación mecánica durante largos períodos de tiempo, fundamentalmente en sus modalidades controladas y con sedación, en las que posteriormente se necesitará un proceso de adaptación progresiva a la respiración espontánea.

### 1.3.4.2. Factores y mecanismos metabólicos-estructurales

La Inflamación y el Estrés Oxidativo. Los mecanismos mediante los cuales los procesos inflamatorios y la presencia de estrés oxidativo conllevan alteración de la función muscular son múltiples. Es conocido que el incremento de determinados mediadores inflamatorios puede alterar directamente la capacidad contráctil del músculo e inducir incremento en la degradación de sus proteínas (5, 39). Los niveles de TNF- $\alpha$  se han relacionado tanto con la atrofia y pérdida de masa muscular, como con la inducción de estrés oxidativo y la disminución de fuerza contráctil (37, 52, 53). Por otra parte, la alteración del equilibrio redox, genera estrés oxidativo, el cual produce generalmente efectos nocivos sobre la estructura (activación de sistemas proteolíticos con degradación proteica, daño muscular, modificación del ADN...) y alteración directa de la función muscular (54-59).

La Hipoxia y la Hipercapnia por sí mismas pueden ser mecanismos de disfunción muscular (60). En este sentido en condiciones normales existen múltiples moléculas que participan en la transformación de la energía en contracción muscular, entre ellos destacan el ATP, el Adenosín Difosfato (ADP), los hidrogeniones ( $H^+$ ), los iones magnesio ( $Mg^{2+}$ ), el fosfato inorgánico (Pi) y la fosfocreatina (PCr). En términos globales la musculatura esquelética se fatiga al existir una alteración en el equilibrio metabólico habitual. Es decir, por a la acumulación de productos de degradación ( $H^+$  o Pi) o la disminución en la cantidad de los componentes que producen energía (ATP, ADP o PCr). Cuando se genera la degradación de la PCr, se forma simultáneamente Pi y se eleva el lactato, produciendo un incremento en la concentración de los  $H^+$  y por consecuencia una reducción del pH intracelular. La concentración elevada tanto de  $H^+$  como de Pi, produce una reducción en la sensibilidad miofibrilar del  $Ca^{2+}$  y una alteración secundaria del proceso de contracción muscular. Adicionalmente a la hipoxemia, la acumulación de ácido láctico y la acidosis secundaria a la hipercapnia producen una alteración en la glucólisis y el ciclo de Krebs, reduciendo la producción de la ATP. Todos estos procesos producen una alteración de la contracción de la fibra muscular y disfunción muscular. Por otra parte, durante la hipoxemia se produce un descenso de la saturación de oxígeno ( $SaO_2$ ) y de su contenido arterial ( $CaO_2$ ). En ocasiones, podría producirse también un descenso del flujo sanguíneo de las extremidades, debido principalmente al aumento del flujo sanguíneo en los músculos respiratorios necesario para mantener una correcta bomba ventilatoria en condiciones adversas. En determinadas circunstancias, si el evento clínico que propició la situación de hipoxia no se resuelve, la demanda de  $O_2$  para mantener las necesidades ventilatorias sobrepasa a la disminuida oferta, lo que facilitará el fracaso ventilatorio.

La desnutrición, expresada como la reducción del peso o de la masa corporal, puede generar falta de aminoácidos esenciales para la correcta formación de proteínas y reparación del músculo. Habrá entonces una reducción de la masa muscular y cambios en la composición fibrilar (61).

Enfermedades Neuromusculares. Pueden tener mecanismos fisiopatológicos muy dispares con diferentes niveles de gravedad. La disfunción muscular es la consecuencia directa de la enfermedad y puede aparecer en situación inicial o avanzada. En general, la disfunción muscular respiratoria es el principal factor pronóstico en la mayoría de las enfermedades neuromusculares.

Fármacos. Uno de los principales fármacos que ha demostrado su implicación en la disfunción muscular son los esteroides, enterales o parenterales. Se ha observado que son capaces de desencadenar una miopatía tanto aguda como crónica (46) e incluso condicionar la supervivencia de los pacientes (62).

### 1.3.5. La Reparación-Regeneración muscular

La reparación del músculo es un proceso constante que ocurre en situaciones de normal actividad muscular. Sin embargo, este proceso regenerativo puede verse incrementado cuando se produce daño muscular. El daño muscular, como se ha mencionado ya, es una alteración estructural que según su magnitud condicionará una disfunción del músculo. La reparación, pues, hace referencia a los procesos celulares necesarios para subsanar el daño muscular o la atrofia, e intenta preservar las características metabólicas y funcionales del músculo.

La reparación del músculo estriado se lleva a cabo gracias a las células satélite, que poseen capacidad de regeneración. Se describieron en 1961 por Mauro (63), están localizadas entre la membrana basal de la fibra muscular y el sarcolema, y generalmente se encuentran en estado quiescente (inactivo). Se activan en respuesta a diversos estímulos (lesión, ejercicio, denervación,...)(38, 64-66), y una vez activadas migran y se fusionan con las miofibras para reparar en daño existente, renovar los núcleos apoptóticos o incluso generar nuevas fibras (Fig. 3). Esta ordenada progresión de eventos implica la acción de proteínas específicas, también expresadas de forma secuencial (40) (Fig. 4).

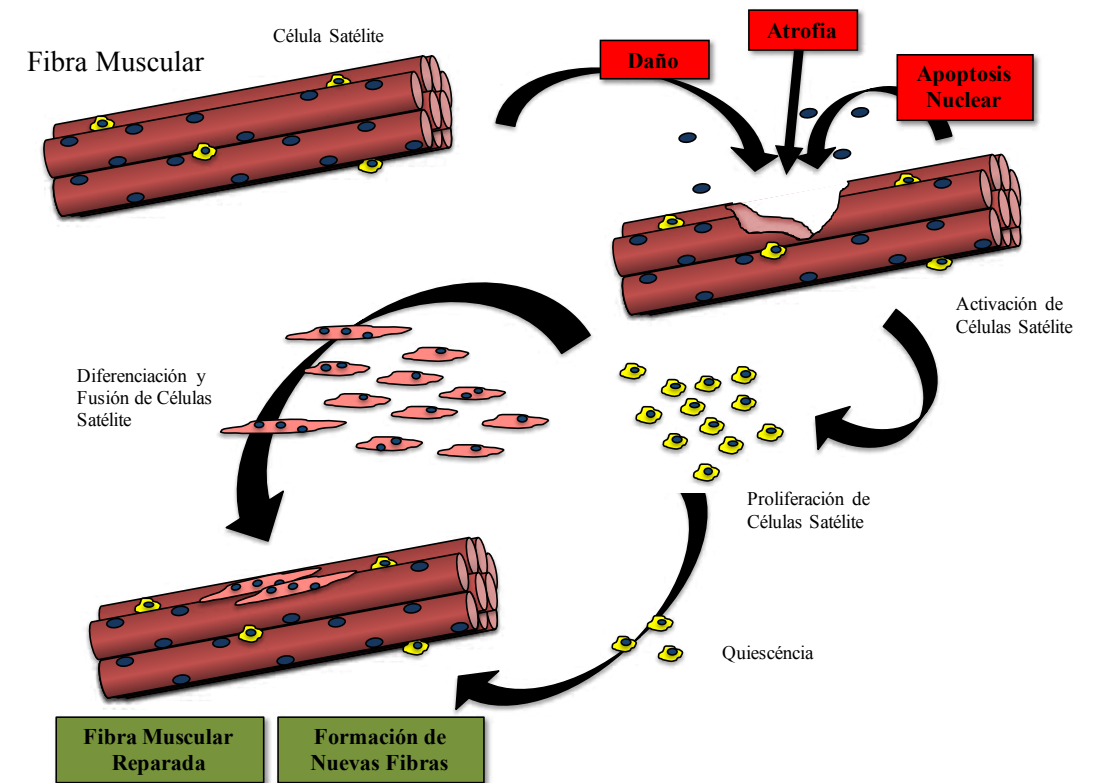


Fig. 3. Proceso de regeneración muscular. Activación, proliferación, diferenciación y fusión de las Células Satélite durante el proceso.



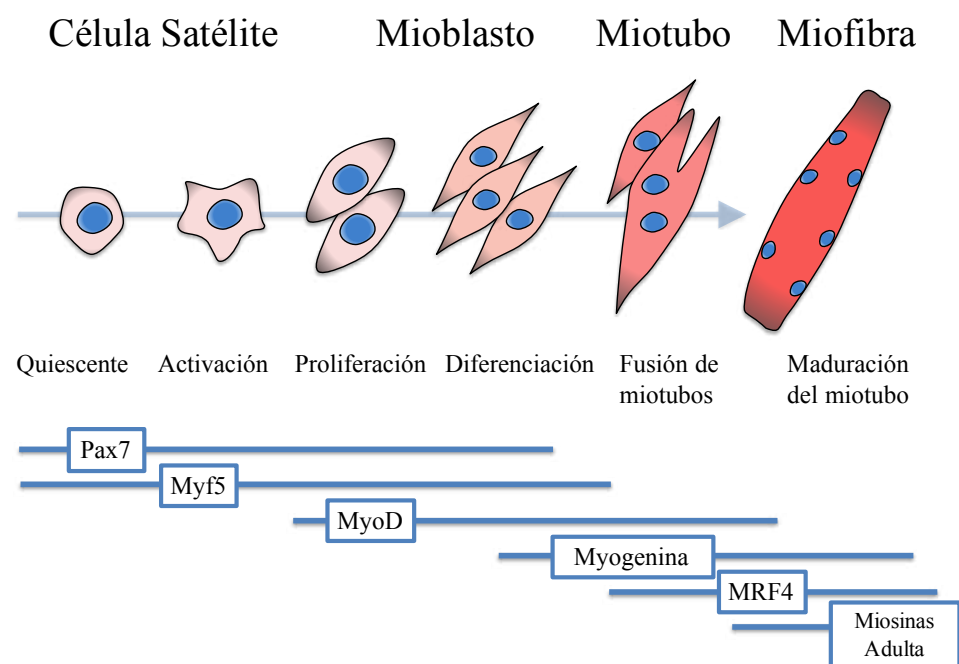


Fig. 4. Proceso de regeneración del músculo esquelético. Se muestra la activación secuencial de los principales genes implicados.

No debe confundirse Regeneración con Remodelación, pues esta última es un proceso de cambio (con daño previo o no) del fenotipo muscular en respuesta a diversos estímulos. Durante este proceso es posible que se produzcan cambios en la expresión de las isoformas de cadenas pesadas de Miosina (MyHC) y en otros componentes musculares, como la densidad capilar, el número de mitocondrias o la longitud de las sarcómeros, y por lo tanto, en las características metabólicas y funcionales del músculo.

#### 1.4. Modelo clínico de inflamación crónica de baja intensidad: La EPOC

La EPOC es una enfermedad caracterizada por la obstrucción poco reversible al flujo aéreo, consecuencia de cambios estructurales en el parénquima pulmonar y en la vía aérea, como consecuencia principalmente del hábito tabáquico (67) aunque también se han descrito otros factores etiológicos (68).

En los últimos años se ha puesto énfasis en la importancia de los aspectos inflamatorios y las manifestaciones sistémicas asociadas a la EPOC (69, 70), principalmente porque pueden condicionar el pronóstico de los pacientes. Entre las principales manifestaciones sistémicas destacan las alteraciones a nivel cardiovascular, del sistema nervioso central y periférico, alteraciones del metabolismo óseo, la anemia, deficiencias nutricionales y caquexia y la disfunción muscular (71), de la que se hablará posteriormente. Por todo ello, hoy en día se considera que la EPOC es una enfermedad de carácter multidimensional.

##### 1.4.1. La inflamación y el estrés Oxidativo y nitrosativo en la EPOC

Podríamos considerar que la EPOC se asocia a una forma constante y atenuada de Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS) (3, 72). Así, se ha demostrado por diversos autores el aumento en los niveles de citoquinas y células inflamatorias en un porcentaje importante de pacientes con EPOC (73-77). Por otra parte, y como ya se ha comentado previamente, los niveles de TNF- $\alpha$  se han relacionado tanto con la atrofia y pérdida de masa muscular, como con la inducción de estrés oxidativo y la disminución de fuerza contráctil (37, 52, 53). Sin embargo, cabe recordar también que esta citoquina puede participar asimismo en la reparación muscular tras el daño. En este sentido estudios recientes realizados por nuestro grupo mediante un modelo animal de cargas ventilatorias, han demostrado que la inhibición de TNF- $\alpha$  magnifica la lesión provocada en el diafragma por el sobreesfuerzo mecánico (78). Esto sugiere que el papel del TNF- $\alpha$  en el músculo es más complejo de lo que se había pensado inicialmente.

Por otra parte, la propia inflamación, el tabaquismo, el sedentarismo, la hipoxia y otras situaciones que presentan los pacientes con EPOC, alteran el equilibrio redox (79), generando estrés oxidativo. Éste produce efectos nocivos sobre la estructura (activación de sistemas proteolíticos con degradación proteica, daño muscular,...) y función musculares (54). A su vez, el estrés oxidativo puede actuar recíprocamente como señal para la expresión de moléculas proinflamatorias. En el caso del músculo esquelético, el Estrés Oxidativo conllevará una disminución de la fuerza (57), sea en

las extremidades (53, 80), o en el diafragma (52), aunque parece ser que los músculos periféricos podrían estar más afectados. Por otra parte se han relacionado los niveles de estrés con el grado de carga mecánica que soportan estos pacientes (81).

Entre los sistemas antioxidantes capaces de compensar los niveles elevados de ERO destacan el de la Super Óxido Dismutasa (SOD) y el de la Catalasa. El desequilibrio entre los sistemas oxidante y antioxidante es el que determinará finalmente el estado de oxidación-reducción de un tejido (82). La nitrificación de aminoácidos en concreto conlleva entre otros efectos, la pérdida de algunas proteínas estructurales y la inactivación y pérdida de función de algunas enzimas necesarios para la contracción muscular.

Cabe destacar que los pacientes con EPOC a menudo presentan empeoramiento agudo de los síntomas generalmente secundario a procesos infecciosos pulmonares (exacerbaciones). En estas situaciones se observa un incremento en la carga inflamatoria pulmonar y sistémica así como un incremento de la carga mecánica y metabólica (83) con un empeoramiento de la afectación musculatura esquelética. Algunos autores también han descrito una reducción de la masa muscular y de la fuerza durante el transcurso de una exacerbación (84).

### 1.4.2. Disfunción muscular en la EPOC

La disfunción muscular es una manifestación extrapulmonar frecuente en la EPOC (85). Como ya hemos mencionado anteriormente existen múltiples factores y mecanismos biológicos que contribuyen a la disfunción muscular en estos pacientes. En términos generales, la obstrucción de la vía aérea y la alteración de la caja torácica afectarán principalmente a los músculos respiratorios, aunque la limitación funcional generada por los mismos puede terminar repercutiendo en los periféricos. En la misma dirección, el sedentarismo afectará principalmente a los músculos de las extremidades (sobre todo inferiores). El humo del tabaco, la hipoxia, la hipercapnia, la acidosis, la malnutrición, la edad, las comorbilidades, los tratamientos concomitantes, etc., afectarán a todos los grupos musculares aunque cabe destacar que se ha observado que, a pesar de que ambos grupos musculares (respiratorios y periféricos) son de estructura estriada y están sometidos a los mismos factores sistémicos, las características de su disfunción tienen elementos particulares (39, 86).

#### 1.4.2.1. Disfunción en los músculos respiratorios en la EPOC

La función del diafragma, músculos intercostales externos y paraesternales puede estar alterada en los pacientes con EPOC, expresándose como reducción tanto de su fuerza contráctil como de su resistencia (87). Por una parte esto es debido a los cambios en la configuración del sistema respiratorio por la hiperinsuflación pulmonar, lo que conlleva el aplanamiento del diafragma y un acortamiento de la longitud de las fibras musculares, generando una situación contráctil desfavorable (87). Adicionalmente los músculos respiratorios deberán sobreponerse al incremento de la resistencia al flujo de aire secundaria a la obstrucción, lo cual dificulta aún más el trabajo de los mismos.

Por otra parte, esta disfunción de los músculos respiratorios puede ser resultado del daño muscular ocasionado por el incremento del trabajo ventilatorio y la presencia de estrés oxidativo y nitrosativo (88). Inicialmente se creía que podía existir atrofia muscular en el diafragma de estos pacientes, pero los estudios más recientes no han hallado cambios significativos en el tamaño de las fibras musculares del diafragma (89). La hipoxia, la hipercapnia, el estado nutricional y el uso de medicamentos con conocida acción sobre la función muscular (corticoides) también han sido implicados en la disfunción muscular respiratoria (73, 90-95).

Sin embargo, cabe destacar que también coexisten cambios que podríamos considerar como adaptativos en los músculos respiratorios de estos pacientes. Estos cambios permiten mantener relativamente la función contráctil. Por una parte en el diafragma existen cambios en la estructura y tamaño de las sarcómeras para adaptarse a una mejor contracción (96), así como un aumento de la capacidad aeróbica del músculo, al incrementarse el número de mitocondrias (97) y capilares (96). Por otra parte también se ha observado que las fibras musculares del diafragma de estos pacientes expresan mayor contenido de miosina de tipo I (96) lo que favorecería la capacidad de resistencia muscular. Contrariamente a lo que ocurre en el diafragma, en los músculos intercostales externos de los pacientes con EPOC podría existir un incremento de la expresión de miosina de tipo II (98). Esto probablemente es debido al reclutamiento intermitente y de alta intensidad de estos músculos. Sin embargo, no todos los autores han reportado este último cambio. En este sentido, Levine et al observaron un incremento en la proporción de fibras de tipo I y un incremento de la expresión de MyCH I en los músculos intercostales-paraesternales en un pequeño grupo de pacientes con EPOC (99).

Cuando los pacientes con EPOC presentan una agudización, la situación generalmente empeora. La inflamación de la vía aérea, la hiperreactividad bronquial y la hipersecreción de moco aumentan el grado de obstrucción bronquial e incrementan las necesidades de trabajo ventilatorio. El incremento en la frecuencia respiratoria (FR) provocará además un aumento de la relación inspiración/expiración, con un descenso del tiempo espiratorio y un progresivo atrapamiento aéreo (hiperinsuflación dinámica). El diafragma más aplanado y acortado, se hallará en una situación más desfavorable para una correcta contracción del mismo. Por otra parte, la mayor alteración pulmonar del intercambio de gases puede condicionar un menor aporte de oxígeno al músculo, lo que en presencia de unas altas necesidades mecánicas derivará a un mayor desequilibrio entre la demanda y la oferta metabólicas.

#### 1.4.2.2. Disfunción en los músculos periféricos en la EPOC

A finales del siglo pasado se observó que un número significativo de pacientes con EPOC presentaban una menor tolerancia al ejercicio por debilidad de las extremidades inferiores, coexistiendo con la limitación ventilatoria (100, 101). Al igual que ocurre en la musculatura respiratoria, los pacientes con EPOC tienen una pérdida de fuerza y resistencia en los músculos de las extremidades (41, 102, 103), así como una menor eficiencia en la contracción (104, 105). Tradicionalmente se considera que esto es un determinante de limitación funcional ante el esfuerzo en muchos de estos pacientes. Así, se sabe que los pacientes con EPOC presentan una disminución de la fuerza de las extremidades (102, 106), y ésta está relacionada con la distancia recorrida en la prueba de marcha de 6 minutos, y la capacidad máxima de consumo de oxígeno (102). Por otra parte, también se ha observado una debilidad de la fuerza de prensión manual en estos pacientes (107), aunque parece ser que la disfunción de las extremidades superiores es relativamente menor que la de las inferiores (102, 104).

El cuádriceps de los pacientes con EPOC presenta una menor masa muscular (108, 109) y un menor número de capilares (110) que los sujetos sanos. Desde un punto de vista molecular estos pacientes también muestran una menor concentración de mioglobina (111) y una atrofia de las fibras de tipo I y tipo II (111, 112). Además se observa un viraje de fibras de tipo I a fibras con isoformas de miosina tipo IIx (113). A pesar de todo, se ha demostrado que existe un aporte correcto de oxígeno al músculo cuádriceps (114, 115) aunque precisa de mayores cantidades de este gas que los sujetos sanos para una misma carga, esto indicaría una probable alteración en la eficacia de utilización del oxígeno intracelular (bioenergética)(115).

Uno de los principales factores de disfunción de los músculos de las extremidades es la reducción de su actividad. Generalmente ésta es secundaria a la limitación funcional respiratoria, pero existe también una tendencia al sedentarismo general en los países desarrollados (116). Como ya se ha comentado anteriormente, el decondicionamiento conlleva la atrofia de las fibras musculares y la consecuente disfunción (117). Se han observado similitudes estructurales en el músculo de sujetos con situaciones que implican inmovilización y los de enfermos con EPOC, lo que apoyaría que el decondicionamiento juega un papel importante en la disfunción muscular en estos pacientes (118). Por otra parte el entrenamiento es capaz de revertir muchas de las alteraciones musculares periféricas de los enfermos con EPOC (119).

La pérdida de peso y masa muscular, así como su grado extremo (caquexia), es otra de las causas de disfunción muscular, y ésta en ocasiones se observa en subgrupos de pacientes con EPOC. Se ha visto que tanto la caquexia como la disfunción muscular son factores independientes de mortalidad (120-124). La prevalencia de alteraciones nutricionales varía según la definición de este trastorno, el estadio de la enfermedad y el área geográfica en que se ha llevado a cabo el estudio (125-127). Al parecer su presencia es más prevalente en el norte de Europa y América que en países del área mediterránea (126). Por otra parte, los mecanismos moleculares que conducen a la caquexia en estos pacientes son múltiples, pero en general se considera que existe un desequilibrio entre los procesos catabólicos y anabólicos, con el resultado de una pérdida del contenido de proteínas en el músculo (95).

#### 1.4.3. Reparación-regeneración muscular en la EPOC

Las causas y mecanismos biológicos que conducen a la pérdida de masa muscular y atrofia en estos enfermos son múltiples, pero se acepta que están condicionados por un desequilibrio entre los procesos anabólicos y catabólicos del músculo, con resultado de pérdida de proteínas (95). Por otra parte, también se ha observado un incremento en el nivel de lesión y el número de núcleos apoptóticos en el músculo cuádriceps de pacientes con EPOC, con y sin pérdida de peso (128, 129). El proceso de regeneración muscular tiene un importante papel como mecanismo regulador de la masa muscular (130), previniendo o mitigando la atrofia y reparando la lesión del músculo. En el momento actual parece confirmado que el número global de células satélite está conservado en los músculos de las extremidades de los pacientes con EPOC, pero su funcionalidad regenerativa podría hallarse disminuida (131, 132). Sin embargo, se desconocen muchos de los detalles de dicha deficiencia, y si ésta es consecuencia de cambios intrínsecos y permanentes en las células satélite, o depende fundamentalmente del entorno tisular en que éstas se hallan. Estudios recientes con cultivos celulares muestran resultados controvertidos al respecto (131-133).

Existen diferentes estímulos que pueden iniciar el proceso de reparación muscular (con recuperación *ad integrum* o bien, con remodelado del tejido). El más habitual es el daño sarcolémico y/o el daño sarcomérico (134, 135). Se podría especular que los músculos respiratorios, al estar en una serie continua de ciclos contracción-relajación, se hallan en un proceso constante de daño-reparación (136, 137) no siendo esta la situación en el músculo cuádriceps. En el diafragma de pacientes con EPOC la reparación vendría seguida de un nuevo fenotipo más adaptado, caracterizado por un incremento en el número de mitocondrias, de los vasos sanguíneos y de las fibras de tipo I y IIa. En los músculos de las extremidades de los pacientes con EPOC en cambio se ha observado una disminución en tamaño de las fibras y una reducción del porcentaje de las del tipo I, de la densidad capilar, la concentración de mioglobina y de varios enzimas de la vía glucolítica (111, 112, 138, 139).

#### 1.4.4. Calidad de Vida relacionada con la Salud en la EPOC

Desde hace pocos años está cobrando especial importancia la valoración del deterioro de la calidad de vida relacionado con la salud (CdVRS o HRQoL) en estos pacientes. Generalmente este deterioro es debido a los síntomas tanto respiratorios como psicológicos y sistémicos, la disminución de la capacidad física y el uso de medicación (45). Se podría considerar que la CdVRS es un biomarcador de la enfermedad, puesto que refleja el impacto de ésta sobre las vidas de los pacientes. Por otra parte hay que destacar que la CdVRS se ha relacionado con el FEV<sub>1</sub> (140-142) y el índice BODE (*Body mass index, Obstruction, Dyspnea y Exercise*) (143). Actualmente la gran mayoría de ensayos clínicos y estudios en pacientes con EPOC incluyen cuestionarios de calidad de vida, pues ésta se considera un *outcome* clínico mayor.

Para la valoración de la CdVRS en los pacientes con EPOC se han elaborado multitud de cuestionarios, los cuales incluyen generalmente dominios relativos a los síntomas, el nivel funcional, el estado de ánimo y los factores sociales (141, 144). Existen dos tipos de cuestionarios para evaluar la CdVRS: genéricos y específicos. Los cuestionarios genéricos se emplean en pacientes con diferentes tipos de patologías e incluyen un amplio rango de dimensiones. Generalmente permiten hacer comparaciones de pacientes con distintas enfermedades pero son menos sensibles para detectar cambios. Por otra parte los cuestionarios específicos están diseñados para evaluar una enfermedad concreta, incluyen las dimensiones relevantes de cada patología y generalmente son más sensibles en la detección de los efectos de las intervenciones terapéuticas. Entre los cuestionarios más utilizados destacan:

##### a) SF36

Es un cuestionario genérico autoadministrado de 10 minutos de duración. Consta de 36 ítems que proporcionan información sobre las dimensiones de función física, función social, limitaciones del *rol*, problemas físicos, problemas emocionales, bienestar o salud mental, vitalidad, dolor, evaluación y percepción de la salud general (145). Esta escala tiene un recorrido de 0 (peor estado de salud) hasta 100 (el mejor) en cada dimensión. Se calculan dos puntuaciones generales: La actividad física y la salud mental.

##### b) Saint George Respiratory Questionnaire (SGRQ)

Es un cuestionario adaptado al idioma español (146) que es específico y diseñado para valorar y cuantificar el impacto de la EPOC y el asma en el estado de salud y el bienestar. Al tratarse de un cuestionario específico, es capaz de detectar mejor los cambios en el impacto de la enfermedad. Consta de 50 ítems divididos en 3 escalas: síntomas, actividad e impacto de ésta. Preferentemente es un cuestionario autoadministrado, aunque se acepta la realización mediante entrevista personal. Cada dimensión tiene un recorrido de 0 (sin alteración) hasta 100 (máxima alteración).

#### 1.4.5. Mortalidad en la EPOC

En 1977 Fletcher et al. describieron la historia natural de la EPOC incluida su relación con el hábito tabáquico y el descenso progresivo del FEV<sub>1</sub> (147). Desde entonces se han relacionado múltiples biomarcadores con la mortalidad de los pacientes con EPOC, siendo el FEV<sub>1</sub> uno de los más ampliamente estudiados (148-154). En 2009 Kohansal et al recrearon las curvas del declive funcional de Fletcher en la cohorte de Framingham (con un seguimiento más prolongado, incluyendo mujeres en el análisis y con disponibilidad de datos de la espirometría estandarizada). Los autores concluyeron que los pacientes fumadores presentaron un mayor declive temporal del FEV<sub>1</sub>, y que el cese temprano a la exposición tabáquica producía un efecto beneficioso sobre la función pulmonar. Así, desde hace décadas el FEV<sub>1</sub> se ha convertido en el principal biomarcador para medir la evolución y la respuesta al tratamiento en los pacientes con EPOC, siendo uno de los *outcomes* clínico-fisiológico más importantes en estos pacientes.

Recientemente numerosos estudios han puesto de manifiesto la capacidad predictiva de mortalidad del cociente capacidad inspiratoria/capacidad pulmonar total (IC/TLC) (155-157). Esta variable refleja la hiperinsuflación estática y puede ser utilizado para aproximar la hiperinsuflación dinámica durante el ejercicio y predecir

la tolerancia al mismo (155, 158-160). Por otra parte los metros recorridos en la prueba de la marcha de los 6 minutos (158, 161), las exacerbaciones (162), la escala de disnea (163, 164), el IMC (121, 165), la masa muscular (166) y la fuerza del músculo cuádriceps (124) también se han relacionado con la mortalidad en los pacientes con EPOC. Cabe destacar que algunos de ellos presentan incluso una mayor capacidad predictiva que el FEV<sub>1</sub> (140, 141, 155, 162).

Recientemente se han agrupado varios de éstos parámetros para crear diversos índices clínicos, con la intención de incrementar la potencia de predicción de los mismos. En este sentido cabe destacar el índice BODE, con una mayor fuerza de correlación con la mortalidad que las variables aisladas (141, 143, 144).

#### 1.4.6. Rehabilitación en la EPOC

Está ampliamente demostrado que el entrenamiento general de la fuerza y resistencia de las extremidades inferiores se asocia a una mejoría de la capacidad de ejercicio y calidad de vida en estos pacientes (43, 44). También se ha demostrado una mejoría en su masa magra, al producirse un incremento en la síntesis de proteínas, disminuir su degradación y reducirse la inflamación (167, 168). A pesar de los beneficios clínicos obvios, existen resultados controvertidos respecto al impacto sobre los niveles de inflamación y del equilibrio redox de los distintos programas de rehabilitación y entrenamiento en estos pacientes (115, 169).

Los programas de entrenamiento de alta intensidad parece tener un papel destacado en la rehabilitación de los pacientes con EPOC (71) aunque se cree que no todos los pacientes pueden verse beneficiados en la misma medida. Por ejemplo, parecería ser que en aquellos pacientes con EPOC y alteraciones de su composición corporal existe una inadecuada respuesta del antioxidante glutatión ante el ejercicio (170, 171). Por otra parte, programas excesivamente cortos (3 semanas) también han demostrado inducir un incremento en los niveles de estrés oxidativo y nitrosativo en el músculo cuádriceps de pacientes con EPOC grave (172). En cambio programas más largos ya no demuestran este efecto (173). Así pues, se considera que la intensidad y la duración del entrenamiento son esenciales para predecir la respuesta de los pacientes. Cabe destacar que se desconoce si el entrenamiento general induce alteraciones del equilibrio redox e inflamación en los músculos respiratorios en particular de pacientes con EPOC. En todo caso se sabe que el ejercicio de estos músculos puede inducir un incremento de lesión en los mismos (135) aunque si se mantiene por un espacio de tiempo de unas 5-6 semanas, es capaz de inducir remodelación muscular, con aumento del tamaño de las fibras y del porcentaje de fibras aeróbicas (174).

### 1.5. Modelo clínico de inflamación aguda de elevada intensidad: La Sepsis

La sepsis se caracteriza por la respuesta sistémica del organismo ante una infección establecida, en forma de fiebre, taquicardia, taquipnea y leucocitosis. Se define como sepsis grave aquella en que se produce además la disfunción de un órgano, hipoperfusión periférica manifiesta y/o hipotensión arterial. Si existe además un fracaso multiorgánico se denominará *shock séptico* (175). La sepsis es una de las principales causas de mortalidad en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) no coronarios (176), y en España se estima su incidencia en 367 casos por cada 100.000 adultos/año, con una mortalidad aproximada del 13% (177).

#### 1.5.1. La Inflamación y el Estrés Oxidativo y Nitrosativo en la Sepsis

Durante la sepsis se produce la migración de los leucocitos hacia los lugares donde la inflamación esté presente. Esta migración está mediada por factores quimiotácticos, productos bacterianos y componentes del complemento (178). El TNF- $\alpha$  se ha relacionado con el *shock* endotóxico (179) y se cree que es el principal mediador en la sepsis, desempeñando un papel central en el inicio de la respuesta inflamatoria (180). En este mismo sentido se ha demostrado que la introducción de TNF- $\alpha$  recombinante en un animal de experimentación induce también alteraciones fisiopatológicas características de la sepsis. En algunos tipos de sepsis (meningococemia) los niveles circulantes de TNF- $\alpha$  son altos y se correlacionan con la mortalidad (181). También la IL-1 $\beta$  se ha demostrado que tiene una implicación relevante como mediador en el *shock séptico* (182). Por otra parte, algunos estudios han demostrado que la IL-6 es el mejor predictor de mortalidad relacionada con la sepsis (183). Reinhart et al observaron que los pacientes sépticos con IL-6 elevada (>1000 pg/ml) tuvieron una mayor mortalidad (56 %, frente al 40% de aquellos por debajo de ese nivel) (184). Debe precisarse además que unos niveles persistentemente elevados de IL-6 en plasma (y no valores máximos de tipo episódico) son predictores negativos en los pacientes con *shock séptico*.

Por otro lado, es sabido que el aumento en la síntesis de moléculas inflamatorias puede conducir a un incremento en la producción de EROs y ERNs. Cuando el primero de estos incrementos no es neutralizado por los sistemas antioxidantes celulares aparece estrés oxidativo. Además, la síntesis excesiva de NO da lugar a la formación de ERNs como el ONOO<sup>-</sup>, mediante su unión al O<sub>2</sub><sup>-</sup>. El ONOO<sup>-</sup>, a su vez, puede unirse a residuos proteicos como la tirosina, dando lugar al fenómeno de nitración de proteínas. En este sentido, se ha demostrado previamente (55, 56, 185, 186) que el aumento de proteínas oxidadas y nitradas en los músculos respiratorios de animales sépticos contribuía de forma preponderante a su disfunción ventilatoria. Uno de

los escasos estudios en pacientes sépticos se puso de manifiesto un aumento de la formación de ERNs en el recto del abdomen (187). Sin embargo, todavía no se dispone de información acerca de los potenciales fenómenos oxidativos e inflamatorios en los músculos respiratorios de estos enfermos.

### 1.5.2. La disfunción muscular en la Sepsis

La disfunción de los músculos respiratorios en el curso de una sepsis es una causa frecuente de insuficiencia respiratoria, y ésta es causa frecuente a su vez de la muerte de los pacientes. Por otra parte, la sepsis ha demostrado ser también un componente determinante en la miopatía general del paciente crítico, habiéndose implicado diversos mediadores inflamatorios que serían liberados durante el propio proceso (188). La afectación muscular también podría estar relacionada con un aporte insuficiente de oxígeno y nutrientes debido a diversos factores ligados a la propia sepsis, al *shock* y/o al distrés asociado (hipoperfusión, *shunt* intrapulmonar o hipoxemia refractaria, etc.)

En el torrente sanguíneo, el oxígeno es transportado de dos maneras: disuelto y en combinación con la hemoglobina. A nivel periférico el aporte de O<sub>2</sub> al tejido (*Oxygen Delivery*, OD) viene determinado por el gasto cardíaco (Q<sub>T</sub>) y por el contenido arterial de oxígeno (CaO<sub>2</sub>), atendiendo a la siguiente fórmula:

$$OD = Q_T \times CaO_2$$

El Q<sub>T</sub> nos vendrá determinado a su vez por la frecuencia cardíaca (FC) y los mililitros de sangre expulsada en cada latido (*Stroke Volume* o SV). Por su parte el CaO<sub>2</sub> nos vendrá determinado por la cifra de hemoglobina (Hb), su saturación con oxígeno (SaO<sub>2</sub>) y el contenido de este gas disuelto en sangre. Todo ello queda expresado en la siguiente fórmula:

$$CaO_2 = (1,34 \times SaO_2 \times Hb) + (0,003 \times PaO_2)$$

Finalmente, el cociente de aporte de oxígeno a los tejidos (COD) será la relación entre el aporte de oxígeno (OD) y su consumo (VO<sub>2</sub>), indicándonos el grado de equilibrio metabólico del tejido.

$$COD = OD / VO_2$$

El fracaso respiratorio en la sepsis se ha atribuido tradicionalmente al cortocircuito pulmonar (*shunt*) secundario a la ocupación alveolar característica del distrés respiratorio (SRDA o Síndrome del Distrés Respiratorio Agudo). A esto se sumaría el

estado del sistema cardiovascular que condiciona una bajo aporte de oxígeno a la periferia. Sin embargo, existen datos que demuestran que en la sepsis se produce también un fracaso en la bomba ventilatoria (189), así como la disfunción de los músculos periféricos (de las extremidades) (190), sugiriendo una posible alteración específica de la célula muscular esquelética. Existen diversos factores que parecen implicados en el desarrollo de dicha alteración. Algunos de ellos serían comunes, y otros serían específicos para determinado grupo muscular. Entre ellos destacan:

- 1 Desequilibrio entre el aumento de las necesidades metabólicas del músculo respiratorio [debido al incremento de las demandas ventilatorias (191)] y la pobre extracción de oxígeno que éste realiza como resultado de la taquicardia e hipotensión.
- 2 Alteración en la concentración de mediadores sistémicos que interfieren en la generación de la fuerza muscular. Principalmente el NO, los EROs, y diversas citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 y IL-6 (82), como se ha comentado previamente.
- 3 Inactividad relativa de los músculos. El estado de postración y la ventilación mecánica provocan una reducción total o parcial en la actividad muscular, condicionando la atrofia y otros fenómenos deletéreos en los músculos de las extremidades que generarán disfunción (192). Además, la alteración de los músculos ventilatorios en pacientes críticos se ve favorecida por otros factores acompañantes como podrían ser el propio proceso séptico, las alteraciones nutricionales, algunos de los fármacos utilizados, la hipoxia y la hipercapnia. Además, la disfunción muscular respiratoria en sujetos sometidos a ventilación mecánica es debida a diversos factores. El factor principal es que existe un decondicionamiento por la falta de la actividad propia del músculo. En este sentido una correcta elección del modo ventilatorio y de la sedación, así como su utilización el mínimo tiempo necesario son esenciales para minimizar las consecuencias del decondicionamiento. Por otra parte generalmente estos pacientes se encuentran en una situación clínica grave y, como se ha comentado anteriormente con los pacientes con sepsis, existe una liberación de mediadores inflamatorios y de estrés oxidativo que tienen efectos deletéreos sobre la función muscular. También pueden coexistir alteraciones nutricionales en el contexto general de enfermedad grave.

La progresiva participación del paciente en la respiración, la correcta nutrición, la rehabilitación precoz y el tratamiento correcto de la enfermedad de base son básicos para poder destetar al paciente de la ventilación mecánica. Actualmente en los algoritmos clínicos para el manejo de la ventilación mecánica invasiva (inicio, modificación o retirada) se incluyen medidas de determinación y preservación la función muscular respiratoria.

# 2

## Hipótesis general

## 2. Hipótesis general

La disfunción muscular es una manifestación sistémica de diversas entidades, y tiene una grave repercusión en la calidad de vida y mortalidad de los pacientes. El origen de dicha disfunción es complejo y se conocen múltiples factores etiológicos y mecanismos que pueden participar en su aparición. Tanto la inflamación como el estrés oxidativo muscular son procesos deletéreos que dificultan una correcta función contráctil. Pueden estar presentes en situaciones clínicas aparentemente muy dispares, pero que tienen en común la presencia de inflamación sistémica. Es el caso del la EPOC, como paradigma de proceso inflamatorio crónico y de baja intensidad, y la sepsis, como ejemplo de proceso inflamatorio agudo e intensidad muy elevada. Estos dos modelos permitirán ahondar en mecanismos de alteraciones estructurales y disfunción muscular que pueden ser comunes a ambos. Dichos mecanismos pueden verse modificados por el ejercicio intenso y por el entrenamiento en los músculos de pacientes con EPOC. Por otra parte, la presencia de fenómenos de lesión estructural, apoptosis con insuficiencia funcional nuclear y atrofia del músculo requieren de un adecuado funcionamiento de los programas de regeneración. Si estos últimos fracasan, podrían participar en la pérdida de masa muscular que muestran algunos pacientes con EPOC. Finalmente, el conocido incremento de fibras de tipo II en el cuádriceps de estos enfermos, limita su funcionalidad y podría estar asociado a una mayor mortalidad.

**Las Hipótesis y Objetivos concretos de cada uno de los cuatro estudios incluidos en la presente tesis se exponen de forma individualizada precediendo a cada uno de ellos.**





# Métodos. Aspectos generales

## 3. Métodos. Aspectos generales

Los métodos utilizados en los diferentes estudios se resumen brevemente a continuación. Cabe destacar que estos apartados se mencionan detalladamente en los artículos correspondientes.

### 3.1. Población

Los pacientes con EPOC incluidos en los tres primeros se clasificaron según las guías GOLD (67), siendo reclutados en fase estable (sin ninguna exacerbación en los 3 meses previos a la inclusión) y con exclusión de comorbilidades relevantes. Por su parte, los pacientes con Sepsis se incluyeron consecutivamente y el diagnóstico se realizó según las guías internacionales (175). Se excluyeron las sepsis de origen pulmonar. Los sujetos control fueron evaluados mediante anamnesis para descartar cualquier patología respiratoria y presentaron unas pruebas de función respiratoria sin alteraciones (espirometría, volúmenes pulmonares y capacidad de difusión del monóxido de carbono).

### 3.2. Evaluación clínica y funcional

También en todos los pacientes se les realizó una evaluación nutricional mediante el índice de masa corporal (IMC) y diversos parámetros analíticos. En los estudios 1, 2 y 3 a todos los pacientes se les realizó una evaluación funcional pulmonar mediante espirometría, volúmenes pulmonares y medida de la difusión para el monóxido de carbono ( $DL_{CO}$ ) y gases arteriales. Se utilizaron los valores de referencia para población mediterránea (193-195). En los estudios 1 y 3 se determinó además la fuerza prensil de la mano así como la fuerza del cuádriceps (contracción isométrica máxima) y la capacidad de ejercicio (prueba de marcha de 6 minutos y prueba máxima de ejercicio en cicloergómetro), según las guías de la *American Thoracic Society* (ATS) (196). En todos los estudios se recogieron datos sociodemográficos y en el caso concreto del estudio 2 se recogió también la mortalidad.

### 3.3. Biopsias musculares

A todos los pacientes y sujetos control en los diferentes estudios se les realizó una biopsia muscular abierta del vasto lateral del músculo cuádriceps. En los estudios

1 y 4, además, se realizó una biopsia del músculo intercostal externo según técnica de biopsia también abierta descrita por nuestro grupo. En el estudio 1 se realizaron dos tomas de muestras correspondientes respectivamente a antes y después del entrenamiento. Una parte de cada muestra se preservó en formol para ser incluida posteriormente en parafina y análisis histológico. Otra parte se preservó directamente en nitrógeno líquido para ser almacenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Esta parte permitió el estudio a nivel molecular. Finalmente y para el estudio 3, otra porción de músculo se preservó en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) hasta la realización del cultivo primario.

### 3.4. Estudios de histología y biología molecular

Todas las determinaciones biológicas sobre las muestras de los pacientes se realizaron en el mismo centro, IMIM-Hospital del Mar (Barcelona). Las diferentes técnicas de histología y biología molecular utilizadas en los estudios se describen brevemente a continuación, pero se detallarán en los artículos correspondientes.

#### Técnicas inmunohistoquímicas

Con el fin de evaluar la proporción y el tamaño de las fibras musculares en todos los estudios se obtuvieron con un micrótopo secciones seriadas de  $3\ \mu\text{m}$  del tejido embebido en parafina, fijándose a continuación sobre un portaobjetos de vidrio. Se procedió al desenmascaramiento y posterior incubación con anticuerpos específicos para las isoformas I y II de MyHC. En cada portaobjetos se utilizó una lámina sin anticuerpo primario como control negativo. Las imágenes se captaron con una cámara digital adaptada a la lente del microscopio y se procesaron mediante un *software* específico.

Con el fin de evaluar la presencia de células inflamatorias (estudios 1 y 4) se obtuvieron igualmente cortes seriados de  $3\ \mu\text{m}$  de los músculos incluidos en parafina se fijaron sobre un portaobjetos de vidrio. Se procedió al desenmascaramiento y posterior incubación con anticuerpos anti-CD 45 para la identificación de leucocitos en general, y anticuerpos anti-CD 68 para la identificación de macrófagos.

Y finalmente, con el fin de evaluar la proporción de músculo anormal (estudio 3), sobre los cortes de  $3\ \mu\text{m}$  del músculo fijados en un porta de vidrio, se realizó también una tinción de hematoxilina-eosina. Se utilizó una adaptación de metodologías publicadas previamente (197). Brevemente, se utilizaron los criterios de Reid para el cálculo de la fracción anormal del músculo siguiendo el método de recuento de

puntos con gradilla, adaptado a muestras parafinadas. Sobre cada imagen obtenida de las muestras teñida, se proyectó una gradilla de  $7 \times 9$  cuadrados con la ayuda de un programa informático. Cada intersección de la gradilla se clasificó en una de las siguientes categorías: Músculo normal, Núcleos internalizado, Células inflamatorias, Presencia de Lipofucsina, Fibra anormal, Fibra inflamada/necrótica, Vasos u otra categoría no contabilizable. Una vez obtenido el número total de intersecciones para cada categoría se calculó la fracción normal y la anormal del músculo.

#### Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real

El ARN total del tejido muscular se extrajo mediante el reactivo *TRIzol* (estudios 3 y 4). La síntesis del ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc), su amplificación y la cuantificación de la expresión genética se llevó a cabo según el método de comparación del  $C_T$  (*thresholdcycle* o ciclo umbral). Las sondas utilizadas para identificación de marcadores de miogénesis, inflamación o mantenimiento de la masa muscular se describen detalladamente en los diferentes manuscritos (Tabla 2). Para la normalización de la cantidad de ARNm total de cada muestra se utilizó la expresión de los genes de la  $\beta$ -actina y del gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa como controles endógenos (*housekeeping*).

#### Western Blot

Se procedió a la determinación de marcadores de estrés oxidativo y/o miogénesis en los músculos vasto lateral del cuádriceps e intercostal en todos los pacientes y sujetos control. Para los estudios 1, 3 y 4 se homogeneizaron las muestras preservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en un tampón de lisis y calculó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford. En cada uno de los pozos de geles se cargó la misma cantidad de proteínas para todas las muestras. Se realizó electroforesis en una dimensión y las proteínas en el gel se transfirieron a una membrana y se incubaron con los diferentes anticuerpos primarios descritos a continuación: anti 3-nitrotirosina (NT), antiaductos proteicos de malondialdehído (MDA), antigrupos carbonilo, anti aductos proteicos de hidroxenonenal (HNE), anti-MN-superóxido dismutasa (SOD), anticatalasa, anti-MyoD, anti-miogenina, anti-miosina perinatal y anti-miosinas adultas.

Gen (proteína)	Identificación del ensayo	Secuencia que contiene la sonda (5'-3')	Nº acceso Genbank
PAX7 (Pax7)	Hs00242962_m1	GCGACAAAGGGAACCGCTGGACGA	NM_001135254.1
MYF5 (Myf5)	Hs00271574_m1	ATGGCATGCCCGAATGTAACAGTCC	NM_005593.2
MYOD1 (MyoD)	Hs00159528_m1	GCGCCCAGCGAACCCAGGCCCGGA	NM_002478.4
MYF6 (Myf6)	Hs00231165_m1	AGAAAATCTTGAGGGTGGGATTTC	NM_002469.1
MYOG (Miogenina)	Hs01072232_m1	AACCCAGGGGATCATCTGCTCACGG	NM_002479.4
MYH8 (MyH8)	Hs00267293_m1	GATGTTGCAAAGGAGAGAAGCACTT	NM_002472.2
MYH1 (MyHC-I)	Hs00165276_m1	GAGCTTCAGGCACGCATCGAGGAGC	NM_000257.2
MYH2A (MyHC-IIa)	Hs00430042_m1	GGTCTCCAAAGCCAAGGAAACCTA	NM_017534.5
MYH2X (MyHC-IIx)	Hs00428600_m1	GCAAACAGAATCAGGTGAATATTCA	NM_005963.3
TNF (TNF- $\alpha$ )	Hs00174128_m1	GCCCATGTTGTAGCAAACCTCAAG	NM_000594.2
TNFRSF 1A (TNFR1)	Hs00533560_m1	GCTGCCACTGGTCTCTGGAGCTG	NM_001065.2
TNFRSF 1B (TNFR2)	Hs00153550_m1	AGAGAAGCCAAGGTGCCTCACTTGC	NM_001066.2
IL1B (IL-1 $\beta$ )	Hs00174097_m1	TGGAGCAACAAGTGGTGTCTCCAT	NM_000576.2
IL1R1 (IL-1R)	Hs00991010_m1	AGACTATTACAGTGTGGAAAATCCT	NM_000877.2
IL6 (IL-6)	Hs00174131_m1	ATTCAATGAGGAGACTTGCCTGGTG	NM_000600.2
IL6R (IL6R)	Hs00169842_m1	GCCTCCCAGTGCAAGATTCTTCTTC	NM_000565.2
IGF1 (IGF-1Ea)	Hs00153126_m1	TGTGATTTCTGAAGGTGAAGATGC	NM_00111283.1
MGF (MGF)	Hs03986524_m1	CTCAGAGAAGGAAAGGAAGTACATT	NM_00111283.1
IGF1R (IGF1R)	Hs00951562_m1	AAATCGGAGATTTGGTATGACGCG	NM_000875.3
ACTB ( $\beta$ -Actina) House keeping 1	Hs99999903_m1	CCTTTGCCGATCCGCCCGCTCCA	NM_001101.3
GAPDH House keeping 2	Hs99999905_m1	GGGCGCTGGTACCAGGGCTGCTT	NM_002046.3
TBP (TBP)	Hs99999910_m1	TGGGTTTTCCAGCTAAGTCTTGGA	M55654.1

Tabla 2. Sondas utilizadas para la realización de la PCR en tiempo real.

**Tabla 2 abreviaturas:** PAX7, gen de *Paired box 7* (Pax 7); MYF5, gen del factor miogénico 5 (Myf5); MYOD1, gen del factor 1 de diferenciación (MyoD); MYF6, gen del factor miogénico 6 (Myf 6); MYOG, gen del factor miogénico 4 o Miogenina; MYH8, gen de la isoforma perinatal o isoforma 8 de las cadenas pesadas de miosina (MyHC8); MYH1, gen de la isoforma I adulta de las cadenas pesadas de miosina (MyHC-I); MYH2A, gen de la isoforma IIa adulta de las cadenas pesadas de miosina (MyHC-IIa); MYH2X, gen de la isoforma IIx adulta de las cadenas pesadas de miosina (MyHC-IIx); TNF, gen del factor de necrosis tumoral (TNF-); TNFRSF 1A, gen del receptor 1 del TNF- (TNFR1); TNFRSF 1B, gen del receptor 2 del TNF- (TNFR2); IL1B, gen de la interleuquina 1 (IL-1); IL1R1, gen del receptor de la IL-1 (IL-1R); IL6, gen de la interleuquina 6 (IL-6); IL6R, gen del receptor de IL-6 (IL6R); IGF-1, gen del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1 (IGF-1Ea); MGF, gen del factor de crecimiento mecánico (MGF); IGF1R, gen del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF1R); ACTB, gen de la beta actina (-actina); GAPDH, gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; TBP, gen de la proteína de unión a TATA (factor de transcripción que se une a la secuencia de ADN denominada TATA box).

### 3.5. Cultivos celulares de Mioblastos

Para el estudio 3 se aislaron los mioblastos y se evaluaron las capacidades de migración, proliferación y diferenciación de los mismos. Brevemente, para la evaluación de la migración se evaluó la velocidad y la fuerza de tracción de los mioblastos utilizando un microscopio de tracción (FTTM) equipado con una cámara de fluorescencia. En cada caso se evaluaron 50 células seleccionadas al azar. Se captaron imágenes cada 5 minutos durante 6 horas. El desplazamiento de la superficie del gel inducida por las fuerzas de tracción ejercidas por células se calculó mediante la comparación de las imágenes de las perlas fluorescentes obtenidas durante el tiempo del experimento con las imágenes de referencia obtenidas después de la tripsinización y el desprendimiento de las células. Para determinar la deformación del sustrato provocada por fuerzas de tracción se utilizó un algoritmo de velocimetría de imágenes de partículas (198).

Para la valoración de la capacidad de proliferación se utilizó el cálculo del tiempo de duplicación de la población (*Population Doubling Time* o PDT): Los mioblastos se sembraron por triplicado con la misma densidad y las mismas condiciones de medio (PM) en tres placas de petri marcadas con una gradilla. Se contaron el número de células presentes en 16 cuadrados de la gradilla de cada placa, cada día a la misma hora y en los mismos cuadrados durante 10 días consecutivos. El PDT se calculó utilizando la ecuación:  $PDT (hr) = (T2 - T1)/3.32 \times (\log N2 - \log N1)$  donde "T" es el tiempo y "N" el número de células. T1 y T2 son los tiempos en los extremos del crecimiento exponencial de cada cultivo celular.

Y finalmente para la valoración de la capacidad de diferenciación se valoró tanto la expresión de los marcadores transcriptómicos antes mencionados (metodología ya mencionada), como la actividad de la creatinaquinasa (CK): Tras 72 h de la inducción de la diferenciación, los miotubos se extrajeron mediante un buffer de lisis. Posteriormente las muestras se centrifugaron y se utilizó el sobrenadante para la realización del ensayo de la CK utilizando un kit comercial. El ensayo se realizó en 3 ocasiones para cada muestra. La actividad enzimática se normalizó con la concentración total de proteínas determinada por la técnica de Bradford.

### **3.6. Métodos estadísticos**

Dadas las características específicas del diseño de cada uno de los estudios, estos métodos se detallan en cada uno de ellos.



# Resultados

## 4. Resultados

A continuación se presentan los originales publicados (excepto el estudio 3 que se encuentra en proceso de *peer review*).

### **EPOC- Inflamación crónica y de baja intensidad**

#### **4.1. Estudio 1**

Mejoría de la calidad de vida y capacidad de ejercicio sin cambios en la biología muscular tras entrenamiento general de pacientes con EPOC grave.

#### **4.2. Estudio 2**

*Vastus Lateralis Fiber Shift Is an Independent Predictor of Mortality in Chronic Obstructive Pulmonary Disease*

#### **4.3. Estudio 3**

Alteraciones de la regeneración en el músculo cuádriceps de pacientes con EPOC y masa muscular reducida: ¿Consecuencia del microambiente celular?

### **SEPSIS- Inflamación aguda y de elevada intensidad**

#### **4.4. Estudio 4**

Inflamación y Estrés Oxidativo en los músculos respiratorios y periféricos de pacientes con sepsis grave.

#### 4.1. Estudio 1

##### **Mejoría de la calidad de vida y capacidad de ejercicio sin cambios en la biología muscular tras entrenamiento general de pacientes con EPOC grave.**

En situación basal los pacientes con EPOC presentan niveles elevados de estrés oxidativo en sus músculos tanto respiratorios como periféricos. Por el contrario, los marcadores inflamatorios muestran niveles incrementados en el músculo respiratorios pero se hallan reducidos en el de la extremidad inferior.

##### **Hipótesis del Estudio 1**

Los músculos de los pacientes con EPOC muestran signos de estrés oxidativo y actividad inflamatoria.

El entrenamiento general de alta intensidad no incrementará el nivel de estrés ni de marcadores inflamatorios en los músculos de los pacientes con EPOC, si se mantiene por un tiempo adecuado, produciendo además los efectos clínicos beneficiosos.

##### **Objetivo del Estudio 1**

Estudiar en pacientes con EPOC avanzada y composición corporal preservada, las modificaciones inducidas por un programa de entrenamiento general de elevada intensidad y duración estándar sobre la función y biología musculares, así como sobre la función pulmonar, la capacidad de ejercicio y la calidad de vida. De forma más específica, valorar la potencial aparición de alteraciones estructurales, estrés oxidativo e inflamación y las eventuales alteraciones moleculares y estructurales en sus músculos periféricos (vasto lateral) y respiratorios (intercostal externo).



Pascual-Guardia S, Wodja E, Gorostiza A, López de Santamaría E, Gea J, Gáldiz JB, Sliwinski P, Barreiro E; en nombre del proyecto ENIGMA in COPD. [Mejoría de la calidad de vida y capacidad de ejercicio sin cambios en la biología muscular tras entrenamiento general en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica grave](#). Med Clin (Barc). 2013 Mar 2;140(5):200-6. doi: 10.1016/j.medcli.2012.01.025

**Addenda al estudio 1.**

**Tabla 3.** Niveles de marcadores de inflamación en plasma en pacientes con EPOC en situación basal.

	Niveles en Plasma
PCR	1,6±0,5
TNF- $\alpha$	24,5±8,7
IL-6	299,7±96,2
IL-1 $\beta$	23,6±7,3

Tabla 3. Abreviaciones: PCR, Proteína C Reactiva; TNF, Factor de Necrosis Tumoral; IL, Interleuquina).

**Tabla 4.** Comparativa de los marcadores de estrés oxidativo en los músculos cuádriceps e intercostal en pacientes con EPOC en situación basal.

	Vasto Lateral	Intercostal externo	p
Mn-Superóxido dismutasa, DO (ua)	3,58 (2,19)	2,29 (1,47)	<0,05
Catalasa, DO (ua)	1,52 (1,20)	2,48 (2,14)	n.s.
Proteínas carboniladas, DO (ua)	3,11 (2,32)	1,14 (0,79)	<0,001
Aductos proteicos de MDA, DO (ua)	2,92 (1,49)	1,41 (0,77)	<0,001

Tabla 4. Los datos se presentan como mediana (intervalo intercuartílico). DO: densidades ópticas; MDA: malondialdehído; ua: unidades arbitrarias; n.s.: no significativo.

## 4.2. Estudio 2

### *Vastus Lateralis Fiber Shift Is an Independent Predictor of Mortality in Chronic Obstructive Pulmonary Disease*

#### **Hipótesis del Estudio 2**

Los cambios en el fenotipo fibrilar del músculo cuádriceps de pacientes con EPOC pueden ser un factor predictivo de mortalidad.

#### **Objetivo del Estudio 2**

Estudiar las implicaciones de los cambios fenotípicos fibrilares del cuádriceps en la mortalidad de pacientes con EPOC de diversas procedencias geográficas.

Patel MS, Natanek SA, Stratakos G, Pascual S, Martínez-Llorens J, Disano L, Terzis G, Hopkinson NS, Gea J, Vogiatzis I, Maltais F, Polkey MI. [Vastus lateralis fiber shift is an independent predictor of mortality in chronic obstructive pulmonary disease](#). Am J Respir Crit Care Med. 2014 Aug 1;190(3):350-2. doi: 10.1164/rccm.201404-0713LE

### 4.3. Estudio 3

#### **Alteraciones de la regeneración en el músculo cuádriceps de pacientes con EPOC y masa muscular reducida: ¿Consecuencia del microambiente celular?**

Se sabe que los músculos periféricos de los pacientes con EPOC muestran signos de lesión y de apoptosis nuclear, acompañados de atrofia, sobre todo en aquellos con peso y masa muscular reducidos. También se ha descrito recientemente que sus mecanismos de regeneración podrían hallarse alterados.

#### **Hipótesis del Estudio 3**

Los mecanismos de reparación se hallan alterados en el músculo cuádriceps de pacientes con EPOC y bajo peso. Esta alteración impide la correcta evolución del programa de miogénesis y depende de factores intrínsecos y permanentes en sus células satélite.

#### **Objetivo del Estudio 3**

Estudiar la integridad de los mecanismos de reparación en el músculo cuádriceps de pacientes con EPOC, con y sin bajo peso asociado. Como objetivo complementario: Evaluar si en caso de existir alteraciones en dichos mecanismos regenerativos, responden a cambios permanentes en sus células satélite.

## Alteraciones de la regeneración en el músculo cuádriceps de pacientes con EPOC y masa muscular reducida: ¿Consecuencia del microambiente celular?

Carme Casadevall<sup>1,2</sup>, Sergi Pascual-Guardia<sup>1</sup>, Simon García<sup>3</sup>, Esther Puig<sup>1</sup>, Esther Barreiro<sup>1,2</sup>, Xavier Trepal<sup>3,4</sup>, Joaquim Gea<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Servei de Pneumologia, Hospital del Mar. Unitat de Recerca en Múscul i Aparell Respiratori (URMAR), Institut Hospital del Mar d'Inves-tigacions Mèdiques (IMIM). Ciber de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), ISC III. Barcelona.

<sup>2</sup> Departament CEXS, Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona.

<sup>3</sup> Institut de Bioingeniería de Catalunya (IBEC), Barcelona.

<sup>4</sup> Unitat de Biofísica i Bioingeniería, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona.

Financiado por el Plan Nacional (SAF2011-26908), FIS (08/0412, 11/02029 & 12/02534), SGR (2009-SGR-393), Marató de TV3 (07-1010), FUCAP (09), SEPAR (761) y CIBERES.

### Autor de correspondencia:

Joaquim Gea  
Unitat de Recerca en Múscul i Aparell Respiratori. Hospital del Mar  
C/ Dr. Aiguader, 88. Barcelona, E-08003  
Teléfono: (+34) 93 316 0387 Fax: (+34) 93 316 0410.  
E-mail: jgea@parcdesalutmar.cat

### Palabras Clave:

EPOC – Pérdida de masa muscular – Disfunción Muscular – Regeneración – Células satélite

### RESUMEN

La pérdida de masa y función musculares se asocia frecuentemente a la EPOC. Recientemente se ha sugerido que existe un desequilibrio entre fenómenos de lesión y/o apoptosis frente a la eficiencia de la regeneración. **Objetivo:** Evaluar el potencial regenerativo del cuádriceps en pacientes con EPOC y masa muscular reducida. **Métodos:** Se obtuvieron muestras del

músculo en 15 pacientes con masa magra conservada, 15 con masa magra reducida (LFFMI) y 10 sujetos sanos, evaluándose fenotipo fibrilar, proporciones de músculo anormal y de células satélite, así como expresión de marcadores inflamatorios y de regeneración. Finalmente se realizó cultivo primario de células satélite para valorar su capacidad de migración, proliferación y diferenciación. **Resultados:** Los dos grupos con EPOC presentaban menor fuerza muscular e incremento de marcadores sistémicos de inflamación. Además, los enfermos LFFMI evidenciaban en el músculo un área de sección fibrilar reducida, mayor porcentaje de área anormal (sugestivo de procesos activos de lesión y reparación) y células satélite, así como mayor expresión de diversos genes ligados a inflamación, mantenimiento de la masa muscular y fases iniciales de la regeneración que los otros dos grupos, aunque la expresión de marcadores correspondientes a las fases finales no mostraba dicho aumento sino incluso disminución. Sin embargo, en los cultivos de células satélite no se observaron diferencias relevantes entre los diferentes grupos. **Conclusiones:** Los pacientes LFFMI presentan deficiencias en las fases finales de la regeneración muscular. Dichos defectos no parecen persistir *in vitro*, lo que sugiere que se hallan relacionados con factores presentes en el paciente.

### INTRODUCCIÓN

La Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una patología muy prevalente, preveándose que en 2020 será la tercera causa de muerte en el mundo<sup>1</sup>. La EPOC supone además una carga económica significativa, principalmente como consecuencia de las exacerbaciones y de sus manifestaciones sistémicas y comorbilidades. Una de las comorbilidades que más frecuentemente se asocia a la EPOC es la disfunción de la musculatura esquelética<sup>2</sup>, disfunción que se asocia a un deterioro en la calidad de vida<sup>3</sup>. En muchas ocasiones esta situación puede agravarse con la pérdida concomitante de peso y masa muscular. La prevalencia de alteraciones nutricionales en la EPOC varía según la definición, el estadio de la enfermedad o el área geográfica<sup>4-6</sup>, y juntamente con la disfunción muscular, han demostrado ser factores independientes de mortalidad en estos pacientes<sup>7-11</sup>. En los últimos años se han descubierto diversos mecanismos moleculares que subyacen al proceso de pérdida de masa muscular tanto en modelos animales e *in vitro*, como en pacientes con EPOC<sup>12,13</sup>. Las causas y mecanismos biológicos que conducen a la pérdida de masa muscular y atrofia en estos enfermos son múltiples, pero se acepta que condicionan un desequilibrio entre los procesos anabólicos y catabólicos del músculo, con resultado de pérdida de proteínas<sup>13</sup>. Por otra parte, también se ha observado un incremento en el nivel de lesión y el número de núcleos apoptóticos en el músculo cuádriceps de pacientes con EPOC, con y sin pérdida de peso<sup>14,15</sup>. El proceso de regeneración muscular tiene un importante papel como mecanismo regulador de la masa muscular<sup>16</sup>, previniendo o mitigando la atrofia y reparando la lesión del músculo.

La reparación y regeneración del músculo esquelético tras una lesión o pérdida de núcleos, ya sea por ejercicio intenso o como resultado de una enfermedad, está mediada por las células satélite. Éstas son precursoras miogénicas que se localizan entre la lámina basal y el sarcolema de las miofibras<sup>17</sup>. En el adulto generalmente se encuentran en estado quiescente, activándose en respuesta a diferentes estímulos. Una vez activadas, las células satélite proliferan, se diferencian y migran hasta la zona dañada, donde se fusionan con las miofibras existentes para repararlas o facilitar el mantenimiento de su tamaño. Mediante el mismo proceso, también pueden generar nuevas fibras. Esta ordenada sucesión de eventos está controlada por diferentes proteínas reguladoras<sup>17</sup>. Se sabe que la capacidad de reparación del músculo depende del número de células satélite existentes y de su correcta función. Cabe destacar que esta última es el resultado de la relación entre el microambiente en que se encuentran las células ('nicho') y la capacidad de éstas para responder a los diferentes estímulos y llevar a cabo el proceso de miogénesis. En el momento actual parece confirmado que el número global de células satélite está conservado en los músculos de las extremidades de los pacientes con EPOC, pero su funcionalidad regenerativa podría hallarse disminuida<sup>18,19</sup>. Sin embargo, se desconocen muchos de los detalles de dicha deficiencia, y si ésta es consecuencia de cambios intrínsecos y permanentes en las células satélite, o depende fundamentalmente del entorno tisular en que éstas se hallan. Trabajos recientes con cultivos celulares muestran resultados controvertidos al respecto<sup>18-20</sup>.

Nuestra hipótesis fue que en los pacientes con EPOC y masa muscular reducida existe una alteración en la función de las células satélite, con la subsiguiente disminución de su capacidad regenerativa. Dicha alteración no dependería de cambios persistentes en las propias células sino fundamentalmente del entorno tisular proporcionado por el propio paciente, contribuyendo a la pérdida de su masa muscular. Por ello, el objetivo del presente estudio fue examinar el número y el potencial regenerativo de las células satélite en el músculo cuádriceps de pacientes con EPOC y masa muscular reducida, comparándolo con el que poseen dichas células al ser cultivadas en condiciones experimentales.

### MÉTODOS

#### Diseño

Se trata de un estudio transversal, controlado y no aleatorizado, diseñado de acuerdo a las guías TREND y STROBE.

#### Pacientes

Se reclutaron 30 pacientes caucásicos, con el diagnóstico de EPOC según los criterios de las guías GOLD<sup>21</sup>. Los enfermos se clasificaron como EPOC-con bajo peso y masa muscular reducida (LFFMI, n=15) o EPOC-con peso y masa muscular conservadas (NFFMI), atendiendo a sus índices de masa corporal y de masa magra (IMC y FFMI, respectivamente). Los criterios de exclusión fueron la presencia de alguna exacerbación en los tres meses previos a la toma de la muestra muscular, la coexistencia de enfermedad cardíaca, renal, ortopédica, neoplásica o hepática graves, la presencia de una patología inflamatoria sistémica, enfermedad neuromuscular conocida, el uso de corticosteroides parenterales en los últimos 3 meses, así como la toma de fármacos con conocida influencia sobre el músculo (antagonistas del calcio, relajantes musculares, etc.). También se excluyeron aquellos pacientes con antecedentes de abuso de alcohol. Adicionalmente se reclutaron 10 sujetos control sanos, caucásicos, de edades similares a los pacientes, función pulmonar normal y sin alteraciones nutricionales.

#### Aspectos éticos

El estudio fue diseñado de acuerdo con los estándares éticos sobre experimentación humana de nuestra institución y las guías de la *World Medical Association* para la investigación en seres humanos. Durante el estudio se siguieron las directrices nacionales e internacionales (declaración de Helsinki), así como el Código Deontológico de Buenas Prácticas de nuestro centro. Se observó además la normativa legal sobre confidencialidad de datos [Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD)]. El Comité Ético para investigación en humanos de nuestro hospital aprobó el estudio, y todos los participantes firmaron el correspondiente consentimiento informado.

#### Valoración nutricional y funcional

En todos los participantes se determinaron parámetros antropométricos (peso, talla e IMC) y de composición corporal (fundamentalmente FFMI). Esta última se obtuvo mediante impedancia bioeléctrica (Bodystat, Isle of Man, Reino Unido). El criterio para la asignación al grupo de peso y masa magra reducidos fue la presencia de IMC < 21 Kg/m<sup>2</sup>, con FFMI < 16 Kg/m<sup>2</sup> en hombres y < 15 Kg/m<sup>2</sup> en mujeres<sup>2</sup>. También se realizaron pruebas de función respiratoria siguiendo la metodología publicada en estudios previos<sup>5</sup>. Incluyeron espirometría forzada con prueba broncodilatadora, medición de volúmenes pulmonares estáticos y resistencia de la vía aérea por pletismografía corporal, medición de la capacidad de transferencia del monóxido de carbono y gases respiratorios arteriales. Excepto para estos últimos se utilizaron valores de referencia para población mediterránea<sup>22-24</sup>. La fuerza prensil de la mano se determinó utilizando un dinamómetro específico en la extremidad no dominante (JAMAR, Nottinghamshire, Reino Unido), mientras que la fuerza del cuádriceps se evaluó a través de su contracción isométrica máxima (dinamómetro de Biopac Systems Inc, Goleta, CA, EEUU). En ambos casos se tomó el valor superior obtenido

en 3 maniobras válidas y reproducibles. Finalmente se midió la capacidad de ejercicio mediante la prueba de marcha de 6 minutos, según las guías de la *American Thoracic Society* (ATS)<sup>25</sup>.

#### Biopsias musculares y procesamiento inicial de las muestras

Se obtuvieron muestras de la porción *vastus lateralis* del músculo cuádriceps mediante biopsia abierta, siguiendo la técnica mínimamente invasiva publicada previamente por nuestro grupo<sup>26,27</sup>. Brevemente, y tras la aplicación de anestesia local (10 ml de me-pivacaína al 1 %), se realizó una incisión cutánea lineal a nivel del tercio medio del *vastus lateralis*, cara antero-lateral, siguiendo una disección por planos y toma de la muestra en paralelo a la dirección de las fibras. El tamaño de las biopsias fue de aproximadamente 0,5 x 0,5 cm. Cada una de ellas se dividió en 4 porciones, que se procesaron inmediatamente a la extracción. Una de las porciones se fijó en formalina y se incluyó en bloques de parafina para su posterior análisis histológico. Las segunda y tercera porciones se colocaron en crioviales, que se sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido, almacenándose a -80° C hasta su utilización en las técnicas de biología molecular. La última porción se preservó en medio de transporte (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* [DMEM]) para la realización del cultivo primario de células satélite, siempre en un tiempo inferior a 3 horas desde la toma de la muestra.

#### Análisis biológicos

1. Tejido muscular (muestras parafinadas y muestras congeladas)

##### a) Inmunohistoquímica

Con el fin de evaluar la proporción y tamaño de las fibras musculares se obtuvieron con un microtomo secciones seriadas de 3 µm del tejido embebido en parafina, fijándose a continuación dichas secciones sobre un portaobjetos de vidrio. Se procedió al desmascaramiento y posterior incubación con anticuerpos específicos para las isoformas I y II de las cadenas pesadas de miosina (MyHC) (MyHC-I, clon MHC, Biogenesis Inc., Poole, Reino Unido; y MyHC II, clon MY-32, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EEUU). Tras una incubación de 30 minutos en una cámara húmeda con el correspondiente anticuerpo primario, los portaobjetos se lavaron e incubaron durante 30 minutos más con el anticuerpo secundario biotinilado. Esto fue seguido de una incubación de otros 30 minutos con estreptavidina *Horse-radish Peroxidase* (HRP) conjugada y diaminobencidina como sustrato (*kit* LSAB +HRP, Dako Cytomation Inc, CA, EEUU.). En cada portaobjetos se utilizó como control negativo una lámina sin anticuerpo primario. Las muestras se trataron con hematoxilina y fueron montadas para su visualización en un microscopio óptico convencional. Las imágenes se captaron con una cámara digital adaptada al microscopio (Olympus, Series BX50F3, Olympus Optical Co., Hamburgo, Alemania), y se procesaron mediante un *software* específico (Pixera Studio, versión 1.0.4, Pixera Corporation, Los Gatos, CA, EEUU). Las fibras musculares fueron evaluadas utilizando un *software* específico para morfometría (*NIH Image*, versión 1.60, Scion Corporation, Frederick, MD, EEUU), determinándose el área de sección y los porcentajes de cada tipo fibrilar. Se determinaron al menos 100 fibras por muestra.

Con el fin de evaluar la proporción de músculo anormal, se realizó una tinción de hematoxilina-eosina sobre cortes de 3 µm del músculo fijados en un portaobjetos de vidrio. La valoración se realizó utilizando una adaptación de las metodologías publicadas previamente por Reid y McGowan<sup>28-29</sup>. Brevemente, y mediante un programa informático, se proyectó una gradilla de 63 intersecciones sobre cada imagen obtenida de las muestras, y dos observadores independientes clasificaron cada una de ellas en una de las siguientes categorías: músculo de estructura normal, presencia de núcleos internalizados, células inflamatorias, presencia de lipofusina, fibra anormal, fibra inflamada/necrótica, vaso o estructura no contabilizable. Una vez obtenido el número total de intersecciones para cada categoría se calculó la fracción de músculo anormal, indicativa del nivel de lesión y regeneración presentes en la muestra.



presencia de miotubos. Por otro lado se determinó la actividad de la creatinquinasa (CK). Tras 72 h de la inducción de la diferenciación, los miotubos se extrajeron mediante un *buffer* de lisis (0.5% Tritón X-100 e inhibidores de proteasas). Posteriormente las muestras se centrifugaron y se utilizó el sobrenadante para la realización del ensayo de la CK, utilizando un *kit* comercial (Spinreact, Barcelona, España). Brevemente, la CK del extracto celular se combinó con los sustratos y enzimas correspondientes para iniciar las reacciones que concluyen con la producción de NADH, lo que incrementa la absorbancia a 340 nm. El ensayo se realizó en 3 ocasiones para cada muestra. La actividad enzimática se normalizó con la concentración total de proteínas (técnica de Bradford).

Finalmente, se incluyó también el análisis de la expresión de marcadores transcriptómicos seleccionados de proliferación y de las diversas fases de la diferenciación. Para ello se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente para las muestras de tejido. Sin embargo, en este caso el ARN total se extrajo del lisado celular de los mioblastos cultivados.

#### Análisis estadístico

Las diferentes variables numéricas se expresan como media y desviación estándar de ésta, o como porcentajes. Se comprobó la normalidad en la distribución de las variables mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para la comparación de variables entre los diferentes grupos se utilizó el análisis de varianza de una vía, con ajuste de Tukey para comparaciones múltiples. Para el estudio de las correlaciones entre las diferentes variables continuas se utilizaron los coeficientes de Pearson y Spearman, según el caso. Todo el análisis estadístico se realizó con el programa SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL, EEUU). Se consideró significativo un valor de "p" igual o inferior a 0,05.

## RESULTADOS

### Características generales

Las características clínicas, antropométricas y de analítica convencional de los diferentes grupos de estudio se describen en la tabla 2. Como era esperable, los dos grupos de pacientes con EPOC presentaban una obstrucción grave al flujo aéreo, con hiperinsuflación pulmonar, alteración de la capacidad de difusión del CO, hipoxemia y pérdida de fuerza en extremidades inferiores. Los pacientes LFFMI presentaron también una disminución de la fuerza muscular en extremidades superiores, así como una reducción significativa en su capacidad de ejercicio. Además, ambos grupos de pacientes con EPOC mostraban un incremento en los marcadores sistémicos de inflamación, algo más marcado en los enfermos LFFMI.

### Músculo cuádriceps

- Análisis histológico (tabla 3): En los grupos dos grupos de pacientes con EPOC se observó un mayor porcentaje de fibras de tipo II respecto del grupo control. Por otra parte, el grupo de pacientes LFFMI mostró unas fibras de menor tamaño, un incremento en la proporción de músculo anormal (fundamentalmente debido al incremento de núcleos internalizados) y un mayor número de células satélite que los otros dos grupos. Es interesante señalar que los dos grupos de enfermos mostraban un aumento de fibras anormales o con signos de inflamación (indicativo de lesión muscular) respecto del grupo control. Se observó una correlación positiva entre el tamaño de las fibras de tipo II y tanto la fuerza del músculo cuádriceps como la distancia caminada en 6 minutos, y tanto para la población general de pacientes con EPOC (NFFMI y LFFMI) ( $r=0,602$ ,  $p<0,01$ ; y  $r=0,525$ ,  $p<0,01$ , respectivamente), como específicamente para el grupo de LFFMI ( $r=0,561$ ,  $p<0,05$ ; y  $0,525$ ,  $p=0,05$ , respectivamente). Por otra parte, el porcentaje de músculo con fibras anormales o con signos de inflamación correlacionaba inversamente con la fuerza del cuádriceps, tanto en la población global de pacientes con EPOC ( $r=-0,470$ ,  $p<0,05$ ) como en el grupo LFFMI en particular ( $r=-0,584$ ,  $p<0,05$ ).

**Tabla 2.** Características antropométricas, funcionales y analíticas de los sujetos del estudio.

	Pacientes con EPOC	
	NFFMI	LFFMI
	n = 10	n = 15
Sexo (H/M)	8/2	12/3
Edad (años)	62±6	68±10
Peso (Kg)	76±12	71±12
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	27±2	25±3
FFMI (Kg/m <sup>2</sup> )	19±2	18±2
FFMI (Kg/m <sup>2</sup> )	15±1***,xxx	15±1***,xxx
<b>Función Respiratoria y Muscular, Capacidad de ejercicio</b>		
FEV <sub>1</sub> (% pred)	93±9	35±11***
FVC (% pred)	91±8	54±15***
FEV <sub>1</sub> /FVC (%)	75±3	46±10***
RV (% pred)	117±16	188±58*
TLC (% pred)	104±11	113±21
RV/TLC (%)	43±3	65±9***
DLco (% pred)	102±17	51±21***
Kco (% pred)	93±14	59±21***
PaO <sub>2</sub> (kPa)	11.3±0.4	8.7±1.3***
PaCO <sub>2</sub> (kPa)	5.7±0.5	6.1±0.6
Fuerza prensil mano (Kg)	32±6	27±8
QMVC (Kg)	42±11	30±10**
6MWD (m)	528±50	445±114
<b>Parámetros analíticos</b>		
Albumina (g/dl)	4.5±0.4	4.2±0.4
Proteínas totales (g/dl)	6.3±1.5	6.9±0.7
VSG (mm/h)	15±7	29±13*
PCR (mg/dl)	1.6±1.4	0.8±0.7
Fibrinógeno (mg/dl)	384±108	416±90*
TNF-α (pg/ml)	13,9±4,7	23,3±7,5**
IL-1β (pg/ml)	16,5±4,6	22,5±6,6*
IL-6 (pg/ml)	199,3±62,8	266,4±76,6*
CK (U/l)	85,5±16,3	88,7±51,8

Valores expresados como media ± desviación estándar. *Abreviaturas:* EPOC, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; H, hombre; M, mujer; IMC, índice de masa corporal; FFMI, índice de masa magra; FEV<sub>1</sub>, volumen espiratorio máximo en el primer segundo; pred., predicho; FVC, capacidad vital forzada; RV, volumen residual; DLco, capacidad de difusión del monóxido de carbono; Kco, DLco corregida por el volumen alveolar; PaO<sub>2</sub>, presión parcial de oxígeno en sangre arterial; kPa, kilopascal; PaCO<sub>2</sub>, presión parcial de dióxido de carbono en sangre arterial; QMVC, fuerza isométrica voluntaria del cuádriceps; 6MWD, distancia caminada en la prueba de marcha de 6 minutos; VSG, velocidad de sedimentación globular; PCR, proteína C reactiva; TNF-α, factor de necrosis tumoral α; IL-1β, interleuquina 1β; IL-6, interleuquina 6; CK, creatinquinasa; U/l, unidades internacionales. NFFMI, pacientes con BMI y FFMI dentro de la normalidad; LFFMI, pacientes con BMI y FFMI reducidos. Significancia estadística: \*,  $p<0,05$ ; \*\*,  $p<0,01$ ; \*\*\*,  $p<0,001$  entre cualquier grupo de pacientes con EPOC respecto del grupo control. <sup>x</sup>,  $p<0,05$ ; <sup>xxx</sup>,  $p<0,001$  entre pacientes NFFMI y pacientes LFFMI.

- Biomarcadores el músculo: A nivel transcriptómico se observó una mayor expresión de varios de los genes correspondientes a las fases iniciales del proceso de regeneración (Pax7, Miogenina y Myf6) en los pacientes LFFMI. Sin embargo, dicho incremento no proseguía en los genes relacionados con fases más tardías. Así, MyH8 permanecía en un nivel similar al observado en el grupo control (aunque su expresión sí estaba aumentada en el grupo NFFMI), mientras que la expresión de las MyHC adultas se halla-

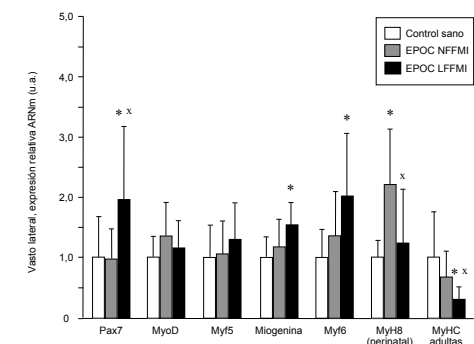
ba disminuida (figura 1). Además, los pacientes LFFMI mostraban una mayor expresión de IL-6 y de los factores de crecimiento IGF-1Ea y MGF que los restantes grupos (figura 2). Por otra parte, la expresión de IGF-1 en estos enfermos correlacionaba significativamente o mostraba una fuerte tendencia a hacerlo tanto con la proporción de músculo anormal ( $r=0,691$ ,  $p<0,01$ ) como la expresión de los diferentes marcadores secuenciales de regeneración (con Pax7,  $r=0,549$ ,  $p<0,05$ ; con Mif5,  $r=0,634$ ,  $p<0,05$ ; con miogenina,  $r=0,527$ ,  $p=0,06$ ; y con Mif6,  $r=0,502$ ,  $p=0,07$ ).

En cuanto a los niveles de las proteínas seleccionadas implicadas en el proceso de regeneración muscular, en el grupo de pacientes LFFMI se observaron niveles de MyoD y Miogenina similares a los de los otros grupos, pero con disminución de las isoformas de miosina perinatal (MyH8) y adultas (figura 3). En este mismo grupo de pacientes, los marcadores sistémicos de actividad inflamatoria correlacionaban con la cantidad de proteína de diversas moléculas relacionadas con la regeneración muscular (datos no mostrados).

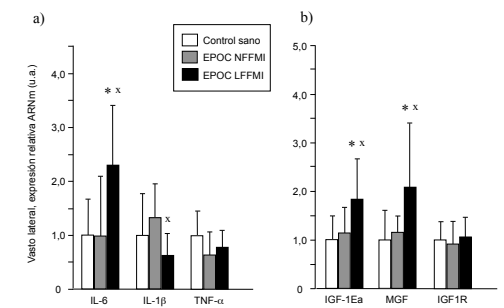
**Tabla 3.** Características histopatológicas del músculo cuádriceps.

	Pacientes con EPOC	
	NFFMI	LFFMI
	n=10	n=15
<b>Características de las Fibras</b>		
Tipo I (%)	41±10	25±13**
Tipo II (%)	59±10	75±13**
Área de sección, fibras tipo I (µm <sup>2</sup> )	2839±233	2903±517
Área de sección, fibras tipo II (µm <sup>2</sup> )	2736±529	2446±476
Área global de todas las fibras (µm <sup>2</sup> )	2783±360	2532±352
<b>Estructura muscular</b>		
Área total de músculo anormal (%)	1.42±0.6	1.66±0.7
Núcleos internalizados (%)	1.0±0.5	1.04±0.8
Fibras anormales*+inflamadas* (%)	0.01±0.02	0.24±0.34*
Células Satélites (%)	1.73±0.87	1.83±0.96

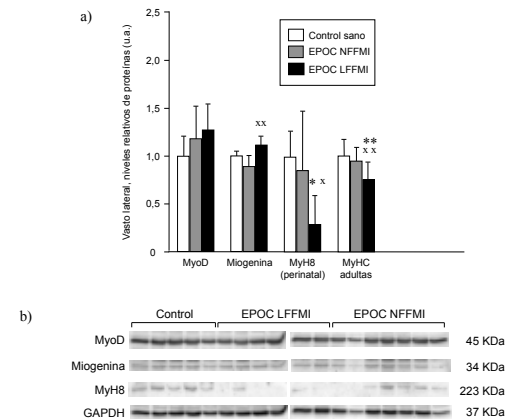
Valores expresados como media ± desviación estándar. Para abreviaturas ver tablas anteriores. Significancia estadística: \*,  $p<0,05$ ; \*\*,  $p<0,01$ ; \*\*\*,  $p<0,001$  entre cualquier grupo de pacientes con EPOC respecto al grupo control. <sup>x</sup>,  $p<0,05$  entre pacientes EPOC NFFMI.



**Figura 1.** Expresión relativa de los diferentes marcadores de miogénesis (ARNm) en el músculo cuádriceps. Para la inclusión de todos los marcadores en una misma escala, los valores se han normalizado. *Abreviaturas:* NFFMI, índice de masa corporal (IMC) e índice de masa libre de grasa (FFMI) dentro de la normalidad; LFFMI, IMC y FFMI reducidos; Pax7, *paired box protein 7*; MyoD, factor 1 de diferenciación; Myf5, factor miogénico 5; Myf6, factor miogénico 6; MyH8, isoforma perinatal de la miosina (MyH8); MyHC, isoformas adultas de las cadenas pesadas de miosina. \*,  $p<0,05$ , entre controles y alguno de los grupos con EPOC. <sup>x</sup>,  $p<0,05$  entre los grupos NFFMI y LFFMI.



**Figura 2.** Expresión relativa de (a) diversos marcadores proinflamatorios y (b) diferentes moléculas clave en el mantenimiento de la masa muscular. Para la inclusión de todos los marcadores en una misma escala, los valores se han normalizado. *Abreviaturas:* TNF-α, factor de necrosis tumoral α; IL-1β, interleuquina 1β; IL-6, interleuquina 6; IGF-1Ea, isoforma estándar del factor de crecimiento similar a la insulina; MGF: factor de crecimiento mecánico; IGF-1R, receptor específico para IGF-1. Resto de abreviaturas ver figura anterior.



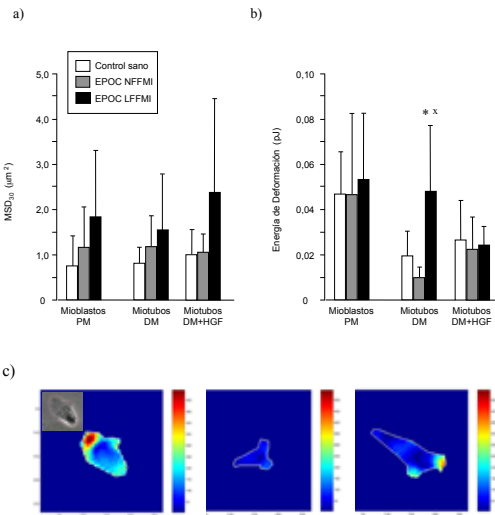
**Figura 3.** (a) Niveles proteicos de algunas moléculas clave en la miogénesis en pacientes representativos de cada grupo. Para la inclusión de todas ellas en una misma escala, los valores se han normalizado. (b) *Western blot* de diversas proteínas seleccionadas en el estudio. *Abreviaturas:* GAPDH, glutaraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; \*\*,  $p<0,01$ , entre controles y alguno de los grupos con EPOC. <sup>xx</sup>,  $p<0,01$  entre los grupos NFFMI y LFFMI. Para el resto de abreviaturas ver figuras anteriores.

### Cultivos celulares

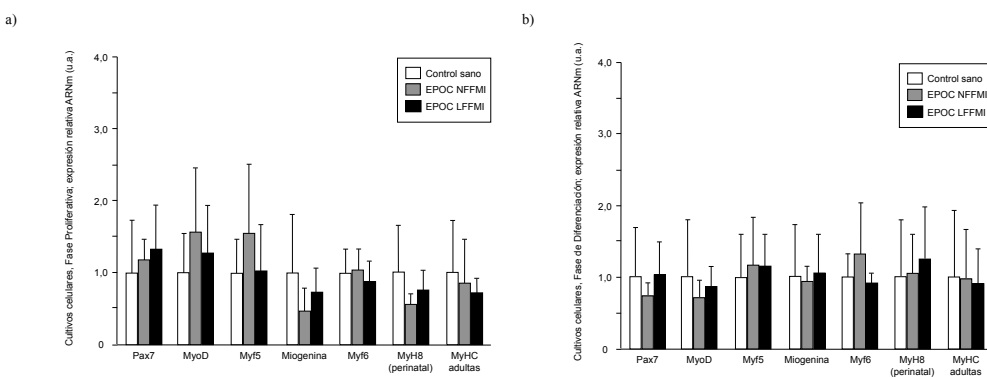
- Propiedades mecánicas de las células (figura 4): Ni la persistencia de trayectoria (datos no mostrados) ni la velocidad de migración celular fueron significativamente diferente entre los tres grupos del estudio en ninguna de las diferentes condiciones evaluadas, aunque se observó una cierta tendencia de las células de pacientes LFFMI a ser más rápidas en sus desplazamientos, sobre todo en DM suplementado con HGF. Además, en condiciones de DM los miotubos de pacientes LFFMI mostraron mayor fuerza aplicada sobre el sustrato que los de los otros dos grupos. No se observaron diferencias significativas entre los tres grupos respecto del tropismo de las células. Interesante señalar finalmente que en todos ellos, las células en fase de proliferación ejercieron más fuerza sobre el sustrato que las ya diferenciadas.



- Proliferación: No se encontraron diferencias significativas en la capacidad de proliferación de los mio blastos entre los diferentes grupos del estudio (datos no mostrados).  
- Diferenciación: Tampoco se observaron diferencias en la expresión génica ni de los diferentes biomarcadores secuenciales del proceso de regeneración, ni en los marcadores ligados al mantenimiento de la masa muscular o la inflamación entre los diferentes grupos del estudio (figura 5). En la misma dirección, y tras 72 h de inducción de la diferenciación, tampoco se observaron diferencias significativas en la actividad de la CK.



**Figura 4.** Características mecánicas de las células en cultivo: (a) MSD<sub>30</sub>, desplazamiento medio; (b) energía transmitida por la célula al sustrato; (c) Fuerza de tracción ejercida por las células, el color indica la magnitud de dicha fuerza, de azul (menor intensidad) a rojo (mayor intensidad). *Abreviaturas:* PM, medio de proliferación; DM, medio de diferenciación; HGF, factor de crecimiento de los hepatocitos.



**Figura 5.** Expresión de diversos marcadores en los cultivos celulares tanto en fase proliferativa (a) como en fase de diferenciación (b). Para la inclusión de todos los marcadores en una misma escala, los valores se han normalizado. *Abreviaturas,* ver figuras anteriores.

## DISCUSIÓN

Los principales y más novedosos hallazgos de este estudio son que las alteraciones en las fases finales del proceso de regeneración muscular que se observan en pacientes con EPOC y baja masa magra, no han sido detectados en los cultivos celulares de sus células satélite. Estas se comportan como las de los sujetos sanos, tanto en sus propiedades mecánicas, como en su capacidad de proliferación y diferenciación. Por otro lado se confirma que estos pacientes presentan disfunción muscular periférica global, que se asocia a inflamación sistémica. Sus fibras son además de tamaño más reducido y muestran signos histológicos que sugieren la presencia de niveles incrementados de lesión y fases iniciales de regeneración muscular, lo que se acompaña de un número moderadamente aumentado de células satélites y de la activación de los programas de regeneración, que sin embargo y como se ha comentado, parecen fracasar en su finalización. Todo ello sugiere que la clave del fracaso de los mecanismos reparadores se halla en el microambiente tisular presente en los pacientes con EPOC y reducción de su masa muscular y no en las propias células satélite.

Las alteraciones en la función y estructura musculares observadas en el presente estudio son consistentes con la literatura previa. En este sentido, numerosos artículos han reportado que los pacientes con EPOC (sobre todo si se acompaña de masa corporal o muscular reducida) pueden mostrar una reducción en la fuerza de los músculos de diferentes territorios, lo que tiene indudables consecuencias sobre su capacidad de ejercicio, calidad de vida y mortalidad<sup>11,36-38</sup>. Con respecto a la estructura muscular, también existen numerosos trabajos que demuestran que en el cuádriceps de los pacientes con EPOC se produce un incremento en la proporción de fibras de contracción rápida y poco resistentes a la fatiga<sup>39-41</sup>. En cuanto al área de sección fibrilar existe cierta controversia. En general se acepta que se halla disminuida en sujetos con peso corporal o masa muscular reducidas<sup>18</sup>, aunque autores como Whitton et al. ha observado dicha disminución incluso en pacientes con peso corporal conservado<sup>39</sup>. El tipo fibrilar determinante de la atrofia no está claro, para unos autores responde sobre todo a las de tipo I<sup>18</sup> mientras que otros la atribuyen predominantemente a las de tipo II<sup>40</sup>. En el presente trabajo, se observó atrofia fibrilar sólo en los pacientes LFFMI, y tanto de las fibras tipo I como de las tipo II. Además, existía una relación significativa entre el tamaño de estas últimas y la fuerza del músculo. En este sentido, se sabe que tanto la reducción en la masa muscular general como la atrofia fibrilar son potenciales contribuyentes a la pérdida de función del músculo cuádriceps en pacientes con EPOC<sup>2,42</sup>.

A nivel molecular, la pérdida de masa muscular y la atrofia fibrilar parecen relacionados con el desequilibrio entre la síntesis y la destrucción de proteínas<sup>12</sup>. Desde una óptica celular, se ha sugerido que la atrofia depende en parte de un desequilibrio entre la presencia por un lado de daño muscular y actividad nuclear reducida (ligada entre otros factores a la existencia de núcleos apoptóticos en estos pacientes)<sup>15</sup>, y el fracaso de los mecanismos de regeneración muscular por otro<sup>18,43</sup>. Este último proceso depende de las células satélite y de la activación secuencial de una serie de factores reguladores de la miogénesis (MRFs). Las células satélite se hallan habitualmente en estado quiescente en el músculo esquelético, activándose ante determinados estímulos como el daño o la atrofia musculares. El primero puede aparecer en los pacientes con EPOC, tanto por efecto del tabaco, como por el ejercicio o factores ligados a la propia enfermedad<sup>44,45</sup>, mientras que el segundo ha sido repetidamente reportado en subgrupos de pacientes con EPOC<sup>18,39,46,47</sup>. También algunos fármacos de uso frecuente en estos enfermos, como los esteroides, pueden activar los procesos de regeneración<sup>48</sup>. Una vez activadas, las células satélite se diferencian y fusionan con las fibras dañadas o participan en la formación de nuevas fibras<sup>49</sup>. Aunque diversos autores han observado que el número de células satélite, claves para este último proceso, se halla conservado en los músculos de pacientes con EPOC, incluidos los que asocian bajo peso<sup>18,19,46,50,51</sup>, se ha descrito que dichas células se hallan en estado senescente y fracasan en su función regeneradora<sup>18,19</sup>. Esta última conclusión deriva fundamentalmente de los trabajos con pacientes con pérdida de peso o masa muscular, ya que diversos autores no hallan evidencia de dicho fracaso en enfermos con masa muscular conservada<sup>52,53</sup>. Por lo que hace a las células satélite y a la funcionalidad del programa de miogénesis, los resultados del presente estudio son similares a los de otros autores, aunque las diferencias en parte de las metodologías y en los marcadores seleccionados no los hagan totalmente superponibles. Se confirma que el número de células satélite se halla conservado y que, en los sujetos con masa muscular reducida, estas células se hallan incluso incrementadas, siendo capaces de iniciar el proceso de regeneración (como indican tanto la expresión de los marcadores biológicos más precoces como el mayor número de núcleos internalizados, un signo histológico de fusión reciente de células satélite con las fibras preexistentes)<sup>19</sup>. Sin embargo, fracasan los estadios terminales del proceso miogénico, tal como expresan diversos marcadores tardíos. Esto podría contribuir a la atrofia muscular que presentan muchos pacientes con EPOC. Por otra parte, el moderado aumento de células satélite observado en nuestros enfermos con LFFMI puede ser interpretado como un intento de respuesta proliferativa a los potenciales estímulos repetidos presentes en ellos. En estudios anteriores de nuestro grupo, utilizando microscopía electrónica, la técnica considerada *gold standard* para la identificación y el recuento de células satélite, también se han observado ocasionalmente incrementos en el número de estas células en los músculos de pacientes con EPOC<sup>54</sup>. Finalmente, las pequeñas discrepancias entre los niveles de los marcadores transcriptómicos y las correspondientes proteínas, pueden reflejar una alteración de los mecanismos de regulación post-transcripcionales, probablemente presentes en el microambiente muscular de los pacientes con bajo peso<sup>55</sup>.

Los elementos más novedosos y potencialmente provocadores del presente estudio son los relativos a los cultivos celulares. Así, no fue posible encontrar diferencias ni en los marcadores moleculares de proliferación ni en los de diferenciación entre las células musculares procedentes de controles y de pacientes con EPOC, ni siquiera en el subgrupo LFFMI. El estudio de sus propiedades mecánicas, ligadas sobre todo a la migración pero también a la potencia contráctil, tampoco mostró deficiencias en las células de estos últimos. Es más, dichas células exhibían incluso una tendencia a tener mayor velocidad de desplazamiento y sus mio tubos ejercían mayor fuerza sobre el sustrato que las de los restantes grupos. Este es además el primer estudio publicado en que se valoran las propiedades mecánicas ligadas a la migración de mio blastos en pacientes con EPOC, utilizando metodología *cutting-edge* ligada al microscopio de tracción.

En contraste con los estudios anteriores, el presente trabajo incluye un número elevado de sujetos con LFFMI, así como la evaluación de una serie completa de biomarcadores transcriptómicos, que alcanza los estadios finales (isoformas tanto perinatales como incluso adultas de MyHC). Esto se complementa con un método enzimático (actividad de la CK) y la determinación de niveles de proteínas seleccionadas para ser representativas de las diversas fases del proceso miogénico, con el fin de valorar también la eventual regulación post-transcripcional, que de existir podría modificar las conclusiones. También se incluyen en el presente estudio marcadores de moléculas clave en la inflamación y en el mantenimiento de la masa muscular, lo que permite valorar sus relaciones con la miogénesis.

Vistos en su conjunto, nuestros resultados parecen sugerir que la alteración en el proceso de regeneración muscular de los pacientes con EPOC y LFFMI, estaría inducido por factores externos locales y no por cambios permanentes en sus células satélite. Aparentemente, estos resultados estarían en discrepancia con algunas observaciones previas. En una de ellas, realizada en músculo, se demostró el acortamiento de tómeros como expresión de senescencia celular en pacientes con EPOC<sup>18</sup>, un cambio que sería permanente y persistiría en los cultivos (aunque esto último no ha sido todavía demostrado). Entre las limitaciones del presente estudio, debe reconocerse que no se ha evaluado la eventual senescencia de las células satélite. En otro trabajo previo, realizado éste en cultivos celulares, se observó un incremento en algunos de los factores reguladores de miogénesis en las células procedentes de pacientes con EPOC (aunque sin distinción respecto al estado de su masa muscular)<sup>19</sup>. En nuestro estudio, dicho incremento no pudo observarse. Por otra parte, nuestros resultados coinciden plenamente con un estudio muy reciente, en que se observó una proliferación y expresión de factores miogénicos similar en los cultivos de células satélite procedentes de enfermos con EPOC y de sujetos sanos, aunque algunos indicadores estructurales parecían indicar una fusión algo deficiente de los mio tubos en los primeros<sup>20</sup>.

Como resultados complementarios, en el presente estudio se observaron algunos cambios en los marcadores inflamatorios musculares, con aumentos de la expresión de IL-6 y disminución en la de IL-1β en los pacientes LFFMI. No se observó correlación alguna entre los marcadores sistémicos y locales de inflamación, sugiriendo que ambos ámbitos no se hallan directamente relacionados. La presencia y función de marcadores inflamatorios en los músculos de los pacientes con EPOC es un tema controvertido, ya que diversos autores han observado tanto incrementos, como ausencia de cambios o incluso disminución de estas sustancias<sup>53,56-58</sup>. Aunque se sabe que tanto IL-6 como TNF-α son capaces de activar la proliferación y diferenciación de las células satélite a través del aumento de nicotinamida n-metiltransferasa (NNMT), el incremento de la expresión de la primera de estas citoquinas en las muestras de los pacientes LFFMI del presente estudio no proporcionó una correcta finalización de la miogénesis<sup>59</sup>.

Respecto de las moléculas ligadas a la regulación de la regeneración muscular en el medio tisular<sup>60-63</sup>, hemos observado una sobreexpresión, tanto de IGF-1Ea como de MGF en los pacientes LFFMI, lo que podría indicar un intento de superar el efecto de los factores con efecto deletéreo. ¿Cuáles podrían ser dichos factores? Modelos experimentales han demostrado que tanto moléculas proinflamatorias como algunos fármacos beta-agonistas y los esteroides son capaces de dificultar la proliferación y diferenciación miogénica de las células satélite<sup>64-66</sup>. Estudios muy recientes de nuestro grupo en muestras de pacientes con exacerbación parecen apuntar en la misma dirección (datos no publicados). Además, las correlaciones positivas detectadas en el presente estudio entre la expresión de IGF-1Ea, tanto con el marcador histológico de lesión como con la mayoría de los marcadores miogénicos refuerzan el papel de este factor de crecimiento en la respuesta al daño y en la regulación de la capacidad de regeneración del músculo en los pacientes. El tema de la expresión de los factores de crecimiento en el músculo de dicha población es también un tema controvertido, ya que algunos autores han reportado resultados similares a los del presente estudio<sup>58,67</sup>, relacionándolos con la infra regulación de

MiR-1, mientras que otros han observado disminución de estos factores en el músculo de los pacientes con EPOC<sup>56,68</sup>.

Deben considerarse algunas limitaciones del presente estudio, así como sus principales fortalezas. Entre las limitaciones, cabe mencionar la relativa elevada variabilidad de los análisis de expresión génica. Por otra parte, y como ya se ha mencionado, el tamaño de las muestras musculares no permitió extender el análisis de los niveles proteicos a todas las proteínas en las que sí se disponía del nivel de transcriptoma. Finalmente, el diseño transversal del estudio no permite establecer relaciones de tipo causal. En gran parte, estas limitaciones son inherentes a las propias técnicas y a las consideraciones éticas de los estudios en humanos. Las principales fortalezas del estudio son la inclusión de un número suficiente de pacientes LFFMI y con atrofia muscular, ya que esta es precisamente la población diana en que tiene mayor interés estudiar la regeneración muscular, y la evaluación conjunta de función muscular, fenotipo y alteraciones histológicas de las fibras, densidad de células satélite, expresión muscular de

marcadores inflamatorios y factores de crecimiento, y expresión paralela en músculo y cultivos celulares de un amplio abanico de factores de miogénesis. Esto ha permitido también analizar las interrelaciones entre todas estas variables. Finalmente, este es el primer estudio en que se analizan las propiedades mecánicas de las células satélite y los miotubos, no sólo de pacientes con EPOC sino de seres humanos en general. Esto último ha permitido conocer la mayor fuerza de tracción desarrollada por dichas células en las fases de proliferación.

En conclusión, el proceso de regeneración muscular se halla alterado en sus fases finales en el músculo cuádriceps de los pacientes con EPOC, LFFMI y atrofia fibrilar. Nuestros resultados indican que dicha alteración parece depender fundamentalmente de factores presentes en el propio paciente, ya que dichas alteraciones no se han podido observar en las células satélite una vez cultivadas. Si estos resultados se confirman abrirían las puertas a la futura identificación y eventual neutralización terapéutica de dichos factores en los pacientes con EPOC.

## BIBLIOGRAFÍA

- Barreiro E, Sieck G. Muscle dysfunction in COPD. *J Appl Physiol* (1985). 2013;114:1220-1.
- Maltais F, Decramer M, Casaburi R, Barreiro E, Burelle Y, Debigare R, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: update on limb muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189:e15-62.
- Stahl E, Jansson SA, Jonsson AC, Svensson K, Lundback B, Andersson F. Health-related quality of life, utility, and productivity outcomes instruments: ease of completion by subjects with COPD. *Health Qual Life Outcomes*. 2003;1:18.
- Debigare R, Cote CH, Maltais F. Peripheral muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease. Clinical relevance and mechanisms. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:1712-7.
- Coronel C, Orozco-Levi M, Ramirez-Sarmiento A, Martinez-Llorens J, Broquetas J, Gea J. [Low-weight syndrome associated with COPD in our setting]. *Arch Bronconeumol*. 2002;38:580-4.
- Vermeeren MA, Creutzberg EC, Schols AM, Postma DS, Pieters WR, Roldaan AC, et al. Prevalence of nutritional depletion in a large out-patient population of patients with COPD. *Respir Med*. 2006;100:1349-55.
- Gray-Donald K, Gibbons L, Shapiro SH, Macklem PT, Martin JG. Nutritional status and mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153:961-6.
- Landbo C, Prescott E, Lange P, Vestbo J, Almdal TP. Prognostic value of nutritional status in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:1856-61.
- Schols AM, Broekhuizen R, Weling-Scheepers CA, Wouters EF. Body composition and mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr*. 2005;82:53-9.
- Vestbo J, Prescott E, Almdal T, Dahl M, Nordestgaard BG, Andersen T, et al. Body mass, fat-free body mass, and prognosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease from a random population sample: findings from the Copenhagen City Heart Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:79-83.
- Swallow EB, Reyes D, Hopkinson NS, Man WD, Porcher R, Cetti EJ, et al. Quadriceps strength predicts mortality in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2007;62:115-20.
- Gea J, Agusti A, Roca J. Pathophysiology of muscle dysfunction in COPD. *J Appl Physiol* (1985). 2013;111:1222-34.
- Remels AH, Gosker HR, Langen RC, Schols AM. The mechanisms of cachexia underlying muscle dysfunction in COPD. *J Appl Physiol* (1985). 2013;114:1253-62.
- Agusti AG, Sauleda J, Miralles C, Gomez C, Toghres B, Sala E, et al. Skeletal muscle apoptosis and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:485-9.
- Barreiro E, Ferrer D, Sanchez F, Minguella J, Marin-Corral J, Martinez-Llorens J, et al. Inflammatory cells and apoptosis in respiratory and limb muscles of patients with COPD. *J Appl Physiol* (1985). 2011;111:808-17.
- Sartorelli V, Fulco M. Molecular and cellular determinants of skeletal muscle atrophy and hypertrophy. *Sci STKE*. 2004;2004:re11.
- Le Grand F, Rudnicki MA. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19:628-33.
- Therault ME, Pare ME, Maltais F, Debigare R. Satellite cells senescence in limb muscle of severe patients with COPD. *PLoS One*. 2012;7:e39124.
- Therault ME, Pare ME, Lemire BB, Maltais F, Debigare R. Regenerative defect in vastus lateralis muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2014;15:35.
- Pomies P, Rodriguez J, Blaquiere M, Sedraoui S, Gouzi F, Carnac G, et al. Reduced myotube diameter, atrophic signalling and elevated oxidative stress in cultured satellite cells from COPD patients. *J Cell Mol Med*. 2015;19:175-86.
- Vestbo J, Hurd SS, Agusti AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187:347-65.
- Roca J, Sanchis J, Agusti-Vidal A, Segarra F, Navajas D, Rodriguez-Roisin R, et al. Spirometric reference values from a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir*. 1986;22:217-24.
- Roca J, Rodriguez-Roisin R, Cobo E, Burgos F, Perez J, Clausen JL. Single-breath carbon monoxide diffusing capacity prediction equations from a Mediterranean population. *Am Rev Respir Dis*. 1990;141:1026-32.
- Roca J, Burgos F, Barbera JA, Sunyer J, Rodriguez-Roisin R, Castellsgague J, et al. Prediction equations for plethysmographic lung volumes. *Respir Med*. 1998;92:454-60.
- Laboratories ATSCoPSICPF. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:111-7.
- Casadevall C, Coronell C, Minguella J, Blanco L, Orozco-Levi M, Barreiro E, et al. [Analysis of respiratory muscle structure and tumor necrosis and insulin-like growth factor expression in chronic obstructive pulmonary disease: are samples valid if obtained during thoracotomy performed because of localized pulmonary neoplasia?]. *Arch Bronconeumol*. 2004;40:209-17.
- Barreiro E, Coronell C, Lavina B, Ramirez-Sarmiento A, Orozco-Levi M, Gea J, et al. Aging, sex differences, and oxidative stress in human respiratory and limb muscles. *Free Radic Biol Med*. 2006;41:797-809.
- Reid WD, MacGowan NA. Respiratory muscle injury in animal models and humans. *Mol Cell Biochem*. 1998;179:63-80.
- MacGowan NA, Evans KG, Road JD, Reid WD. Diaphragm injury in individuals with airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:1654-9.
- Rawls A, Valdez MR, Zhang W, Richardson J, Klein WH, Olson EN. Overlapping functions of the myogenic bHLH genes MRF4 and MyoD revealed in double mutant mice. *Development*. 1998;125:2349-58.
- Sumariwalla VM, Klein WH. Similar myogenic functions for myogenin and MRF4 but not MyoD in differentiated murine embryonic stem cells. *Genesis*. 2001;30:239-49.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
- Butler JP, Tolic-Norrelykke IM, Fabry B, Fredberg JJ. Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;282:C595-605.
- Nocentini S, Reginensi D, Garcia S, Carulla P, Moreno-Flores MT, Wandosell F, et al. Myelin-associated proteins block the migration of olfactory ensheathing cells: an in vitro study using single-cell tracking and traction force microscopy. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69:1689-703.
- Davis J. Basic Cell Culture. Practical approach. 2nd. ed. Oxford University Press, USA; 2002.
- Gosselink R, Troosters T, Decramer M. Peripheral muscle weakness contributes to exercise limitation in COPD. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153:976-80.
- Gosselink R, Troosters T, Decramer M. Distribution of muscle weakness in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *J Cardiopulm Rehabil*. 2000;20:353-60.
- Degens H, Sanchez Horneros JM, Heijdra YF, Dekhuijzen PN, Hopman MT. Skeletal muscle contractility is preserved in COPD patients with normal fat-free mass. *Acta Physiol Scand*. 2005;184:235-42.
- Whitton F, Jobin J, Simard PM, Leblanc P, Simard C, Bernard S, et al. Histological and morphological characteristics of the vastus lateralis muscle in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Med Sci Sports Exerc*. 1998;30:1467-74.
- Gosker HR, Zeegers MP, Wouters EF, Schols AM. Muscle fibre type shifting in the vastus lateralis of patients with COPD is associated with disease severity: a systematic review and meta-analysis. *Thorax*. 2007;62:944-9.
- Vogiatzis I, Terzis G, Stratakos G, Cherouvim E, Athanasopoulos D, Spetsioti S, et al. Effect of pulmonary rehabilitation on peripheral muscle fiber remodeling in patients with COPD in GOLD stages II to IV. *Chest*. 2011;140:744-52.
- Seymour JM, Ward K, Sidhu PS, Puthuchery Z, Steier J, Jolley CJ, et al. Ultrasound measurement of rectus femoris cross-sectional area and the relationship with quadriceps strength in COPD. *Thorax*. 2009;64:418-23.
- Hansen MJ, Gualano RC, Bozinovski S, Vlahos R, Anderson GP. Therapeutic prospects to treat skeletal muscle wasting in COPD (chronic obstructive lung disease). *Pharmacol Ther*. 2006;109:162-72.
- Orozco-Levi M, Lloreta J, Minguella J, Serrano S, Broquetas JM, Gea J. Injury of the human diaphragm associated with exertion and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:1734-9.
- Orozco-Levi M, Coronell C, Ramirez-Sarmiento A, Lloreta J, Martinez-Llorens J, Galdiz JB, et al. Injury of peripheral muscles in smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Ultrastruct Pathol*. 2012;36:228-38.
- Gosker HR, Kubat B, Schaart G, van der Vusse GJ, Wouters EF, Schols AM. Myopathological features in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2003;22:280-5.
- Puig-Vilanova E, Martinez-Llorens J, Ausin P, Roca J, Gea J, Barreiro E. Quadriceps muscle weakness and atrophy are associated with a differential epigenetic profile in advanced COPD. *Clin Sci (Lond)*. 2015;128:905-21.
- Decramer M, de Bock V, Dom R. Functional and histologic picture of steroid-induced myopathy in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153:1958-64.
- Snow MH. An autoradiographic study of satellite cell differentiation into regenerating myotubes following transplantation of muscles in young rats. *Cell Tissue Res*. 1978;186:535-40.
- Eliason G, Abdel-Halim S, Arvidsson B, Kadi F, Pieh-Aulin K. Physical performance and muscular characteristics in different stages of COPD. *Scand J Med Sci Sports*. 2009;19:865-70.
- Menon MK, Houchen L, Singh SJ, Morgan MD, Bradding P, Steiner MC. Inflammatory and satellite cells in the quadriceps of patients with COPD and response to resistance training. *Chest*. 2012;142:1134-42.
- Plant PJ, Brooks D, Faughnan M, Bayley T, Bain J, Singer L, et al. Cellular markers of muscle atrophy in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010;42:461-71.
- Constantin D, Menon MK, Houchen-Wolloff L, Morgan MD, Singh SJ, Greenhaff P, et al. Skeletal muscle molecular responses to resistance training and dietary supplementation in COPD. *Thorax*. 2013;68:625-33.
- Martinez-Llorens J, Casadevall C, Lloreta J, Orozco-Levi M, Barreiro E, Broquetas J, et al. [Activation of satellite cells in the intercostal muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease]. *Arch Bronconeumol*. 2008;44:239-44.
- Turan N, Kalko S, Stinccone A, Clarke K, Sabah A, Howlett K, et al. A systems biology approach identifies molecular networks defining skeletal muscle abnormalities in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS Comput Biol*. 2011;7:e1002129.
- Crul T, Spruit MA, Gayan-Ramirez G, Quarck R, Gosselink R, Troosters T, et al. Markers of inflammation and disuse in vastus lateralis of chronic obstructive pulmonary disease patients. *Eur J Clin Invest*. 2007;37:897-904.
- Barreiro E, Schols AM, Polkey MI, Galdiz JB, Gosker HR, Swallow EB, et al. Cytokine profile in quadriceps muscles of patients with severe COPD. *Thorax*. 2008;63:100-7.
- Debigare R, Maltais F, Cote CH, Michaud A, Caron MA, Mofarrahi M, et al. Profiling of mRNA expression in quadriceps of patients with COPD and muscle wasting. *COPD*. 2008;5:75-84.
- Kim HC, Mofarrahi M, Vassilakopoulos T, Maltais F, Sigala I, Debigare R, et al. Expression and functional significance of nicotinamide N-methyl transferase in skeletal muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181:797-805.
- Clemmons DR. Role of IGF-1 in skeletal muscle mass maintenance. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20:349-56.
- Ten Broek RW, Grefte S, Von den Hoff JW. Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration. *J Cell Physiol*. 2010;224:7-16.
- Kandalla PK, Goldspink G, Butler-Browne G, Mouly V. Mechano Growth Factor E peptide (MGF-E), derived from an isoform of IGF-1, activates human muscle progenitor cells and induces an increase in their fusion potential at different ages. *Mech Ageing Dev*. 2011;132:154-62.
- Shefer G, Benayahu D. The effect of exercise on IGF-1 on muscle fibers and satellite cells. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012;4:230-9.
- Beiner JM, Joki P, Cholewicki J, Panjabi MM. The effect of anabolic steroids and corticosteroids on healing of muscle contusion injury. *Am J Sports Med*. 1999;27:2-9.
- Langen RC, Schols AM, Kelders MC, van der Velden JL, Wouters EF, Janssen-Heijinger YM. Muscle wasting and impaired muscle regeneration in a murine model of chronic pulmonary inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;35:689-96.
- Duranti G, La Rosa P, Dimauro I, Wannenes F, Bonini S, Sabatini S, et al. Effects of salmeterol on skeletal muscle cells: metabolic and proapoptotic features. *Med Sci Sports Exerc*. 2011;43:2259-73.
- Lewis A, Riddoch-Conteras J, Natanek SA, Donaldson A, Man WD, Moxham J, et al. Downregulation of the serum response factor/miR-1 axis in the quadriceps of patients with COPD. *Thorax*. 2012;67:26-34.
- Vogiatzis I, Simoes DC, Stratakos G, Kourepini E, Terzis G, Manta P, et al. Effect of pulmonary rehabilitation on muscle remodelling in cachectic patients with COPD. *Eur Respir J*. 2010;36:301-10.

#### 4.4. Estudio 4

##### **Inflamación y Estrés Oxidativo en los músculos respiratorios y periféricos de pacientes con sepsis grave**

En modelos animales de sepsis se ha demostrado que existe estrés oxidativo en músculos esqueléticos. En pacientes con dicha entidad sólo existen estudios realizados en músculos de extremidades o no ventilatorios.

##### **Hipótesis del Estudio 4**

La inflamación y el Estrés Oxidativo están aumentados en los músculos respiratorios y periféricos en pacientes con sepsis.

##### **Objetivo del Estudio 4**

En pacientes con sepsis grave en estadios precoces, determinar los niveles de estrés oxidativo e inflamación en sus músculos intercostal externo y vasto lateral, así como las posibles alteraciones estructurales.

Pascual-Guardia S, Árbol F, Sánchez E, Casadevall C, Merlo V, Gea J, Barreiro E. [Inflamación y estrés oxidativo en los músculos respiratorios periféricos de pacientes con sepsis grave](#). Med Clin (Barc). 2013 Sep 7;141(5):194-200. doi: 10.1016/j.medcli.2012.05.026

## 4.5. Resumen de Resultados

### 4.5.1. EPOC- Inflamación crónica de baja intensidad.

#### Estudio 1

En situación basal:

- Se confirma que los músculos de los pacientes con EPOC muestran signos de lesión y estadíos iniciales de reparación.
- Diversos índices de estrés oxidativo, así como la expresión del enzima antioxidante Mn-SOD eran superiores en el músculo cuádriceps respecto del intercostal.

Tras 10 semanas de entrenamiento y respecto a la situación basal, en los pacientes con EPOC:

- Se observó un incremento de la distancia caminada en el test de la marcha.
- Presentaron una mejoría significativa de la carga máxima tolerada y del consumo de oxígeno ( $VO_2$ ) en la prueba de esfuerzo cardiopulmonar.
- Mostraron mejor puntuación en los cuestionarios de calidad de vida (SGRQ y SF-36).
- No se observaron diferencias significativas en ninguno de los índices de estrés oxidativo analizados.
- No se observaron diferencias en la composición fibrilar ni en las alteraciones estructurales musculares sugestivos de daño/reparación.

## Estudio 2

- El porcentaje de fibras de tipo II y la presencia de un viraje fibrilar hacia fibras de tipo II se asocian a un incremento de la mortalidad en pacientes con EPOC que tenían un FEV<sub>1</sub> inferior al 50%.

## Estudio 3

- Los pacientes con EPOC presentaron disfunción muscular y un descenso en la distancia caminada en la prueba de marcha de 6 minutos y un descenso de la fuerza del cuádriceps, siendo este descenso mayor en aquellos pacientes con EPOC y bajo peso.
- En pacientes con EPOC con y sin bajo peso se observó un mayor porcentaje de fibras de tipo II. Por otra parte, en el grupo de pacientes con EPOC y bajo peso, se observó una área de corte transversal de las miofibras inferior al resto de grupos (atrofia).
- En ambos grupos de pacientes con EPOC se observó un aumento de signos indirectos de daño muscular (fibras inflamadas y fibras anormales/inviabiles), en el porcentaje de núcleos internalizados y de células satélite en el músculo.
- En el músculo cuádriceps de los pacientes con EPOC y bajo peso se observó un incremento en la expresión de los genes de PAX7, MYOG y MYF6 (fases iniciales de la regeneración muscular), pero un descenso en la expresión de los genes de MYH8 y correspondientes a la Miosina Adulta (que intervienen en las fases finales).
- En el tejido muscular se observó también un incremento significativo de la expresión de IL-6 y una sobrerregulación de la expresión de IGF-1 y MGF en los pacientes con EPOC y bajo peso respecto del resto de grupos.
- Los niveles de proteínas implicadas en el proceso de regeneración en el músculo cuádriceps, se mantuvo un perfil similar al de los transcriptomas, con un descenso en los niveles relativos de la Miosina neonatal (MyH8) (fases finales del proceso) en el grupo de pacientes con EPOC y bajo peso respecto el resto de grupos.
- En los cultivos primarios, no se observaron diferencias significativas en la capacidad de migración, de proliferación ni en la capacidad de diferenciación. Tampoco se observaron diferencias en la expresión de genes clave de regeneración muscular entre los grupos de estudio.

## 4.5.2. SEPSIS- Inflamación aguda de elevada intensidad.

### Estudio 4

En el músculo intercostal externo de pacientes con Sepsis:

- No se observaron diferencias significativas con los controles para los niveles de estrés oxidativo (proteínas oxidadas y nitradas).
- Se observó un incremento en los valores de ARNm del TNF- $\alpha$  y sus receptores (RI y RII), IL-1 $\beta$ , IL-6 y el marcador CD18.

En el músculo cuádriceps de pacientes con Sepsis:

- Se observó un incremento de grupos carbonilos y aductos proteicos de HNE, así como en los valores de proteínas nitradas.
- Mostraron un aumento en la expresión de TNF- $\alpha$  y sus receptores (RI y RII), IL-1 $\beta$ , IL-6 y el marcador CD18.



# Discusión

## 5. Discusión

La presente tesis doctoral confirma que existen una serie de alteraciones biológicas relevantes en los diversos grupos musculares de pacientes, tanto con EPOC como con sepsis. Estas alteraciones afectan en algunos casos a músculos respiratorios y a músculos periféricos, sugiriendo factores causales fundamentalmente sistémicos. En otras ocasiones, por el contrario, los hallazgos son particulares para cada uno de dichos grupos musculares, lo que sugiere una causa de índole más local. Los hallazgos más relevantes se discuten a continuación. De hecho, ahondar en las causas y consecuencias de la alteración muscular respiratoria y periférica en estos dos modelos de enfermedades inflamatorias es el principal elemento común de los diversos estudios que conforman esta tesis doctoral.

### 5.1. Aportaciones

Por lo que respecta a la EPOC en particular, las alteraciones en la biología del músculo incluyen en primer lugar, y como ya es conocido (57, 59, 111, 113, 199-201), cambios en los porcentajes fibrilares del músculo cuádriceps, que pasa a tener mayor número de fibras de metabolismo predominantemente anaeróbico. Por primera vez se demuestra, con población procedente de diversos países, que la intensidad de dicho cambio es un marcador de mortalidad en estos pacientes, de forma independiente a otros factores (estudio 2).

Por otra parte, nuestro estudio también confirma que los mencionados cambios fibrilares se acompañan de estrés oxidativo, lesión estructural e inicio de regeneración muscular (estudios 1 y 3) (57-59, 129, 135, 172, 201-210). Aunque no se incluyó en la versión final publicada del estudio 1 (ver tabla 4 en el Addendum a Resultados del estudio 1), y también como elemento novedoso, diversos índices de estrés oxidativo, así como la expresión del enzima antioxidante Mn-SOD eran superiores en el músculo cuádriceps respecto del intercostal. Esto sugiere que factores locales, quizás relacionados con la actividad de cada músculo, puedan actuar como moduladores del estrés oxidativo local, lo que a su vez puede parcialmente explicar la diversidad fenotípica en los músculos de estos pacientes.

Como se ha mencionado, la presente tesis también demuestra que los signos de lesión coexisten con la activación del programa de regeneración muscular a nivel del cuádriceps, pero fracasan parcialmente en los estadios finales de la miogénesis en pacientes con masa muscular reducida (estudio 3). Sin embargo, y como



muestran los resultados obtenidos *in vitro*, dichas alteraciones no se mantienen al aislar las células satélite del microambiente del paciente. Este es el primer estudio que demuestra que la alteración en la miogénesis de los músculos periféricos de pacientes con EPOC (elemento que sí había sido observado por autores previos), parece depender de factores presentes en el propio enfermo, y no de cambios permanentes en sus células regeneradoras del músculo. Si en estudios futuros es posible identificar dichos factores, ello podría abrir nuevas vías de tratamiento en la atrofia y la disfunción musculares asociadas a la EPOC.

Si nos centramos en los resultados del entrenamiento en los pacientes con EPOC (estudio 1, fase longitudinal), sorprende que a pesar de que la terapia aplicada puede considerarse como de elevada intensidad, no se produjeron cambios biológicos relevantes, aunque sí una mejoría en algunos *outcomes* clínicos. Es decir, no aumentó el nivel de estrés oxidativo o los signos de lesión/regeneración muscular en ninguno de los dos músculos. Debe señalarse que este es también el primer artículo en que se valoran los signos de lesión y regeneración (análisis histológico) tras el entrenamiento de pacientes con EPOC. La sorprendente falta de cambios biológicos puede responder a diversas razones. Por un lado, la adecuada duración del programa de rehabilitación, que se ha visto que neutraliza los efectos deletéreos del ejercicio intenso (173). Esto podría explicar la ausencia de aumento de estrés y de daño tisular, pero es más difícil de aceptar para la falta de cambios en las proporciones fibrilares. Existen dos explicaciones alternativas, que encajarían mejor con nuestros resultados. O bien la combinación de elementos aeróbicos y anaeróbicos en el entrenamiento produjo un resultado bidireccional, mutuamente neutralizante de los efectos; o bien la gravedad de los pacientes permitió conseguir sólo un cumplimiento suficiente para el condicionamiento cardiovascular (mejoría en la capacidad de ejercicio) pero no para el muscular.

Respecto de la sepsis (estudio 4), que supone un modelo mucho más agudo e intenso de cascada inflamatoria que la EPOC, nuestro estudio demuestra que se produce un intenso incremento en el estrés oxidativo, pero que éste se limita al músculo periférico. Esto sugiere la modulación de la agresión inflamatoria sistémica por factores locales, probablemente la actividad muscular (cabe pensar que disminuida en el cuádriceps y elevada en el músculo respiratorio durante la sepsis). Por otra parte, los componentes celulares ligados a la inflamación en el propio músculo, no mostraron cambios ni en el cuádriceps ni en el intercostal, contrastando con el intenso incremento de varias de las principales citoquinas proinflamatorias y sus receptores en ambos músculos. Esta es la primera vez que se dispone de datos musculares de los grupos respiratorio y periférico en pacientes con sepsis, y los

resultados pueden también ser potencialmente útiles en la búsqueda de nuevos elementos para la terapia (p.e. movilización precoz de músculos periféricos, uso de esteroides sistémicos o terapias biológicas en la fase más aguda de la enfermedad). Como ya se ha comentado, la miopatía y neuromiopatía del paciente crítico son un grave problema en las unidades de cuidados intensivos, y condicionan la vida del paciente tras el alta. Estas entidades limitantes derivadas de la sepsis y sus circunstancias asociadas son de origen multifactorial, pero uno de sus elementos principales es la infección/inflamación, siendo insuficientes los tratamientos actuales.

## 5.2. Relevancia de este tipo de estudios

Como se ve, la afectación funcional del músculo esquelético está presente de forma importante tanto en los pacientes con EPOC (88, 100-102) como en los aquejados de sepsis (177, 179, 181). La importancia fundamental de los diversos estudios incluidos en la presente tesis es la identificación y mejor conocimiento de los fenómenos biológicos que subyacen a la disfunción muscular en estas dos entidades. Dicho conocimiento puede permitir tanto obtener marcadores biológicos de afectación o pronóstico, como orientar hacia nuevas terapias para dicha disfunción.

## 5.3. La EPOC, una inflamación crónica de baja intensidad

La disfunción de la musculatura periférica y la limitación funcional en la EPOC son hallazgos coherentes con la literatura previa. En este sentido, ya Gosselink et al. observaron un descenso de la capacidad de ejercicio y en la fuerza de los diversos músculos (cuádriceps, grupo prensil de la mano, grupos inspiratorio y espiratorio) en pacientes con EPOC (102, 107). Esto es debido a diversos factores; unos sistémicos, que afectan a todos los grupos musculares, y otros locales, que modulan los diversos fenómenos en cada grupo o músculo. Entre los primeros está la pérdida de peso y masa muscular, que por sí mismas ya empeoran el pronóstico vital del paciente (91, 108, 122), como sucede también con la propia disfunción muscular periférica (124). Esta es una de las razones de haber incluido pacientes con y sin pérdida de peso y masa muscular en el estudio 3, ya que los mecanismos biológicos presentes en sus músculos podrían ser diferentes, como confirman nuestros resultados. Por otra parte estábamos muy interesados en conocer los mecanismos celulares de la atrofia muscular que presentan estos enfermos. Hoy en día parece claro que los mecanismos moleculares y metabólicos pasan por un desequilibrio entre la síntesis y la pérdida de proteínas, inducido por diversos factores catabólicos (39, 46, 51, 85, 211). Sin embargo, el tema de los mecanismos celulares no es tan claro, en especial

por lo que hace al estado de la regeneración. Se sabe que existe apoptosis y por tanto, "insuficiencia nuclear" (término que quiere indicar déficit en su misión de inducir la síntesis de proteínas) y lesión en diversas estructuras, pero es todavía poco conocido el estado de los mecanismos reparadores. Nuestro estudio confirma la puesta en marcha de los programas de regeneración (hay un adecuado número de células satélite, que además se activan como muestran tanto la presencia de núcleos internalizados como de marcadores transcriptómicos precoces) (131, 132). Sin embargo, la ejecución de dichos programas parece fracasar en las fases finales (132), lo que explicaría en parte el fenotipo ineficiente de los músculos periféricos en los pacientes EPOC con baja masa muscular. Como ya se ha mencionado, pequeñas diferencias con otros autores en la expresión de uno u otro marcador probablemente dependan de las metodologías empleadas. En la presente tesis doctoral se han explorado también elementos no estudiados en estudios previos, como es el caso de las relaciones entre el programa de miogénesis y tanto los factores de crecimiento más importantes implicados en el mantenimiento de la masa muscular (212, 213), como las principales citoquinas proinflamatorias, observándose que existe una sobreexpresión de diversos de estos últimos marcadores, que además muestran una relación positiva con la miogénesis. Respecto a los factores de crecimiento, nuestros resultados son similares a los de diversos estudios previos (200, 214), aunque están en desacuerdo con lo observado por otros grupos, que han reportado una menor expresión en el músculo de pacientes con EPOC y pérdida de peso (212, 215, 216). En cuanto a las citoquinas proinflamatorias se discute un poco más adelante. Cabe mencionar aquí que nuestro propósito inicial era estudiar también los mecanismos de lesión y regeneración en el principal músculo respiratorio, el diafragma, pero lamentablemente dificultades importantes en el cultivo de sus células satélite han impedido la inclusión de dichos resultados en la presente tesis doctoral.

Por otra parte, nuestros estudios confirman una serie de fenómenos conocidos en la biología de los músculos de los pacientes con EPOC. Es el caso de la composición fibrilar, con adaptaciones divergentes en músculos periféricos y respiratorios. En los primeros sobre todo, es bien conocido el incremento en el porcentaje de fibras de tipo II (57, 111, 113, 199-201), poco resistentes a la fatiga pero de contracción más potente. Cabe destacar que nuestro hallazgo con otros grupos europeos de este viraje en el fenotipo fibrilar se asocia a un incremento en la mortalidad en los pacientes graves o muy graves. La relación entre la atrofia o la disminución de la fuerza muscular con la mortalidad se había demostrado previamente en pacientes con EPOC (124, 160), pero no se conocía que lo mismo sucede con los porcentajes fibrilares. El tamaño de las fibras musculares también se halló disminuida en los pacientes con EPOC y bajo peso, en consonancia con diversos estudios previos (108, 109, 111, 112). En cuanto a

los intercostales externos, se ha observado en la presente tesis una ligera tendencia a tener incrementado el porcentaje de fibras aeróbicas. Esta adaptación, similar a la que se ha observado en el diafragma (217), no sorprende si se considera que este músculo participa activamente en la inspiración de los pacientes con EPOC (46, 51, 85). En ellos el diafragma se halla en una deficiente disposición para cumplir con su cometido como principal músculo inspiratorio. Finalmente, y también relacionado con la histología, nuestros resultados en los estudios 1 y 3 confirman la presencia de signos indirectos de daño muscular, en línea también con estudios precedentes del grupo (207).

En cuanto a los fenómenos de estrés oxidativo e inflamación, además de las aportaciones novedosas antes comentadas, los presentes estudios confirman hallazgos anteriores, fundamentalmente de nuestro propio grupo. Así, el desequilibrio entre elementos oxidantes y antioxidantes se halla roto en los músculos respiratorios y periféricos de los pacientes con EPOC a favor de los primeros, encontrándose evidencias de estrés (8, 27, 55, 59, 88, 90, 133, 205, 206, 210, 218). Por otra parte, en uno de los estudios incluidos en la presente tesis se confirma que existen algunos cambios en la expresión de citoquinas en el músculo cuádriceps de los pacientes. Como ya se ha mencionado anteriormente, existe debate en la literatura respecto de dicha expresión, y así existen trabajos que han demostrado tanto aumento como ausencia de cambios o disminución en dicha expresión (58, 196, 200, 215). Probablemente estas diferencias se deban tanto al estudio de poblaciones con características diversas, como a las metodologías empleadas. Sin embargo, el estudio más extenso, que incluyó enfermos de España, Holanda y Reino Unido, concluyó que dicha expresión estaba fundamentalmente conservada o disminuida en el cuádriceps de los pacientes sin bajo peso (58). Dicho trabajo dio pie a un editorial sobre las diversas propiedades deletéreas y positivas (estas últimas básicamente ligadas a la regeneración) de las citoquinas en el músculo.

Finalmente, hemos observado los efectos del ejercicio intenso en un programa de entrenamiento de duración suficiente, confirmando como ya se ha dicho las mejoras en *outcomes* generales, aunque sin poder observar modificaciones en la biología del músculo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios previos (193), aunque difieren de los observables cuando el programa es excesivamente corto, o se trata de ejercicios intensos pero esporádicos en enfermos no entrenados. En estos casos sí se produce un incremento en la producción de oxidantes, con descenso significativo de la capacidad antioxidante en el músculo cuádriceps de los pacientes, sin mejoría clínica significativa (81, 164-166).

#### 5.4. SEPSIS- Inflamación aguda de elevada intensidad

Se confirma el incremento de marcadores de estrés oxidativo e inflamación en los músculos periféricos de pacientes con sepsis grave respecto, a la vez que por primera vez se muestran resultados que indican lo que realmente sucede en un músculo respiratorio de pacientes con sepsis en condiciones clínicas. En concreto, no aparece estrés oxidativo, aunque sí una expresión aumentada de diversos marcadores proinflamatorios. La ausencia de estrés oxidativo en el intercostal no era previsible dados los resultados previos en modelos animales. A través de dichos modelos se sabía de la presencia de marcadores de estrés oxidativo y nitrosativo en el diafragma séptico, y que éstos desempeñan un papel clave en el deterioro de la contracción muscular (55, 56, 219-221). Probablemente esto último sea consecuencia de la alteración de diversas estructuras y enzimas clave en el desarrollo de dicha función. Es el caso de la oxidación de la la actina, la creatinaquinasa, y otras enzimas clave en la glucólisis o en la síntesis de ATP (56). Como se ha mencionado, es posible que nuestros resultados se deban en parte a la diferente actividad de cada músculo en el paciente con sepsis. Como músculo auxiliar de la ventilación, el intercostal probablemente desarrolló contracciones de baja intensidad, que podrían haber desempeñado un papel “protector”, previniendo el incremento de especies reactivas. Por el contrario, se sabe también por modelos animales que el diafragma se ve obligado a desarrollar contracciones musculares intensas y repetidas en la sepsis, que sí estimularían dicho incremento, explicando los resultados allí observados modelos (81, 170-172). Cabe pensar que el cuádriceps, por el contrario, se halle bastante inactivo en un sujeto séptico, siendo conocido el efecto favorecedor de la inactividad en el desarrollo de estrés (222). En cuanto al incremento en la expresión de la citoquinas proinflamatorias en ambos músculos, pero sin cambios en las células homónimas, probablemente se explique por la síntesis de las primeras en las propias fibras musculares. Estos resultados están en la misma línea que los publicados previamente en modelos animales de endotoxemia (180, 223). El aumento observado en la expresión de citoquinas proinflamatorias en los músculos podría contribuir a la disfunción ventilatoria y muscular periférica que aparece a las pocas horas de evolución del cuadro séptico. Como se ha mencionado, dicha disfunción tiene efectos muy deletéreos sobre el pronóstico vital o la la posterior eventual recuperación del paciente, una vez superado el episodio agudo de sepsis. Finalmente, no sorprende la ausencia de cambios en la estructura muscular de los pacientes, ya que de ocurrir probablemente precisan de una mayor evolución de la enfermedad. Nuestro propósito era estudiar precisamente los cambios biológicos más precoces que ocurren en el músculo.

Deben considerarse algunas limitaciones generales en los diferentes estudios que se incluyen en la presente tesis doctoral. En primer lugar, el número relativamente pequeño de sujetos incluidos en los estudios 1, 3 y 4, y la alta variabilidad de algunos análisis moleculares pueden haber limitado parcialmente el poder estadístico de la investigación. Sin embargo estas limitaciones son o inherentes a las técnicas empleadas o a ser estudios con las restricciones lógicas a estar realizados con pacientes.

En segundo lugar, el diseño transversal de tres de los estudios limita la capacidad de establecer relaciones causa-efecto. Nuevamente, existen limitaciones características de estudios invasivos en seres humanos. Sin embargo, sí han permitido establecer asociaciones. Por otra parte, la determinación de biomarcadores cuya aparición es seriada y la complementación con cultivos celulares en uno de los estudios incluidos, permiten especular razonablemente con la secuencia temporal de eventos miogénicos.

En el primer estudio, una importante limitación fue la falta de grupo control. Sin embargo, la necesidad de realizar biopsias repetidas y tanto de músculo periférico como torácico no permitió conseguir el permiso del comité ético.

Cabe señalar que en el trabajo de sepsis todos los pacientes eran de sexo femenino. Este hecho es atribuible al azar, como consecuencia de su reclutamiento de forma consecutiva, sin tener en cuenta el sexo. De todos modos, pensamos que este factor no ha tenido gran repercusión en los resultados del estudio, dada la edad de las enfermas y el sexo femenino de todos los sujetos control.

Por último, dada la limitada muestra disponible en las biopsias musculares, algunas técnicas que hubiesen sido complementarias, o la determinación de niveles de proteínas adicionales de interés no fueron posibles. Nuevamente, se trata de limitaciones intrínsecas a estudios invasivos en seres humanos, que condicionan el tamaño de las muestras biológicas.



# Conclusiones

## 6. Conclusiones

- 1 Existe una evidencia sólida sobre la presencia de alteraciones biológicas musculares tanto en los pacientes con EPOC (inflamación crónica de baja intensidad), con y sin masa muscular reducida, como en los pacientes con Sepsis grave.
- 2 En el caso de los pacientes con EPOC, se confirma la presencia de cambios en el fenotipo fibrilar del músculo cuádriceps, que se muestran predictivos de mortalidad.
- 3 También se confirma la presencia de daño y estrés oxidativo en músculos periféricos y respiratorios de los pacientes, así de como de lesión estructural, incremento en la expresión de factores de crecimiento, cambios en la expresión de citoquinas inflamatorias, número adecuado de células satélite y activación de los programas de regeneración en los primeros. Sin embargo, en los pacientes con masa muscular reducida parecen fracasar los estadios finales de la miogénesis.
- 4 El mencionado fracaso no se mantiene en los cultivos de sus células satélite, lo que parece indicar que responde a factores presentes en el propio paciente.
- 5 Un entrenamiento con ejercicio intenso y duración adecuada es capaz de inducir la mejoría clínica del paciente, sin provocar fenómenos deletéreos en el músculo esquelético.
- 6 En los enfermos con sepsis grave en fase precoz se produce un aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias tanto en sus músculos respiratorios como periféricos. Sin embargo, sólo los segundos muestran signos de estrés oxidativo. Ambos fenómenos biológicos podrían estar implicados en la disfunción muscular presente en la sepsis, siendo las diferencias entre ambos grupos musculares probablemente atribuibles a la actividad de cada uno en las horas previas.



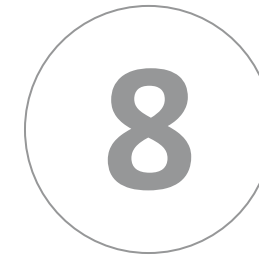
# Perspectivas de futuro

## 7. Perspectivas de futuro

En la actualidad se están llevando a cabo varios estudios como evolución de los resultados de los estudios que se incluyen en la presente Tesis doctoral. En primer lugar, el hallazgo de que existe una alteración en el proceso de reparación-regeneración muscular en los pacientes con EPOC con el potencial regenerativo de las células satélite preservado nos indica que dicha alteración podría encontrarse en el microambiente muscular. Así, se están llevando a cabo cultivos celulares de mioblastos expuestos a suero obtenido tanto de sujetos sanos, como de pacientes con EPOC estable y enfermos con exacerbación de su enfermedad. Cabe destacar que recientemente hemos hallado un bloqueo en el proceso de diferenciación de los mioblastos sometidos a suero de pacientes con EPOC agudizada (224). En la actualidad se está definiendo también el papel de los corticosteroides en estos hallazgos, puesto que también hemos observado que la metilprednisolona aplicada directamente sobre los cultivos celulares en concentraciones estándar, produce efectos similares a los del suero de pacientes exacerbados.

Como ya se ha mencionado, se hallan en fase final los estudios de cultivos de mioblastos obtenidos del diafragma de pacientes y de sujetos control (función pulmonar normal), que permitirán elucidar cuál es el estado de la regeneración muscular en dicho músculo.

Por otra parte, en la actualidad también se está valorando la utilidad de la saturación tisular de oxígeno ( $StO_2$ ) en el manejo y el pronóstico de pacientes con agudización de su EPOC y de pacientes con Sepsis. En este sentido, hemos observado que los pacientes con EPOC muy grave (GOLD IV) presentan unos niveles de  $StO_2$  en el músculo intercostal inferiores a los del grupo control, y que se correlacionan significativamente con la carga máxima tolerada en la prueba incremental de cargas inspiratorias.



# Bibliografía



## 8. Bibliografía

- 1 Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I. Immunology. 7 ed. Philadelphia.2006.
- 2 Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Patología estructural y funcional. 7 ed. Madrid.2005.
- 3 Fabbri LM, Rabe KF. From COPD to chronic systemic inflammatory syndrome? Lancet. 2007;370:797-9.
- 4 Barreiro E, Gea Guiral J, Marin-Corral J. Inflamación, estrés oxidativo y reparación. In: Casan P, Garcia-Río F, Gea Guiral J, editors. Fisiología y Biología Respiratorias. Madrid: Ergon; 2007. p. 243-59.
- 5 Flores EA, Bistrain BR, Pomposelli JJ, Dinarello CA, Blackburn GL, Istfan NW. Infusion of tumor necrosis factor/cachectin promotes muscle catabolism in the rat. A synergistic effect with interleukin 1. J Clin Invest. 1989;83:1614-22.
- 6 Takabatake N, Nakamura H, Abe S, Inoue S, Hino T, Saito H, et al. The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor-alpha system in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 2000;161:1179-84.
- 7 Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1975;72:3666-70.
- 8 Kim HC, Mofarrahi M, Vassilakopoulos T, Maltais F, Sigala I, Debigare R, et al. Expression and functional significance of nicotinamide N-methyl transferase in skeletal muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 2010;181:797-805.
- 9 Zhao Q, Yang ST, Wang JJ, Zhou J, Xing SS, Shen CC, et al. TNFalpha inhibits myogenic differentiation of C2C12 cells through NF-kappaB activation and impairment of IGF-1 signaling pathway. Biochem Biophys Res Commun. 2015;458:790-5.

- 10 Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 1996;87:2095-147.
- 11 Dunne A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE*. 2003;2003:re3.
- 12 Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG, et al. Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:6155-9.
- 13 Lang D, Knop J, Wesche H, Raffetseder U, Kurrle R, Boraschi D, et al. The type II IL-1 receptor interacts with the IL-1 receptor accessory protein: a novel mechanism of regulation of IL-1 responsiveness. *J Immunol*. 1998;161:6871-7.
- 14 Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*. 2003;374:1-20.
- 15 Jones SA, Horiuchi S, Topley N, Yamamoto N, Fuller GM. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J*. 2001;15:43-58.
- 16 Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today*. 1990;11:443-9.
- 17 Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol*. 1994;153:811-6.
- 18 Cantini M, Massimino ML, Rapizzi E, Rossini K, Catani C, Dalla Libera L, et al. Human satellite cell proliferation in vitro is regulated by autocrine secretion of IL-6 stimulated by a soluble factor(s) released by activated monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;216:49-53.
- 19 Warren GL, Hulderman T, Jensen N, McKinstry M, Mishra M, Luster MI, et al. Physiological role of tumor necrosis factor alpha in traumatic muscle injury. *FASEB J*. 2002;16:1630-2.
- 20 Keller P, Penkowa M, Keller C, Steensberg A, Fischer CP, Giralt M, et al. Interleukin-6 receptor expression in contracting human skeletal muscle: regulating role of IL-6. *FASEB J*. 2005;19:1181-3.
- 21 Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev*. 2008;88:1379-406.
- 22 Bodell PW, Kodesh E, Haddad F, Zaldivar FP, Cooper DM, Adams GR. Skeletal muscle growth in young rats is inhibited by chronic exposure to IL-6 but preserved by concurrent voluntary endurance exercise. *J Appl Physiol* (1985). 2009;106:443-53.
- 23 Vingren JL, Budnar RG, Jr., McKenzie AL, Duplanty AA, Luk HY, Levitt DE, et al. The acute testosterone, growth hormone, cortisol and interleukin-6 response to 164-km road cycling in a hot environment. *J Sports Sci*. 2015:1-6.
- 24 Jonsdottir IH, Schjerling P, Ostrowski K, Asp S, Richter EA, Pedersen BK. Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles. *J Physiol*. 2000;528 Pt 1:157-63.
- 25 Febbraio MA, Pedersen BK. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J*. 2002;16:1335-47.
- 26 Toumi H, F'Guyer S, Best TM. The role of neutrophils in injury and repair following muscle stretch. *J Anat*. 2006;208:459-70.
- 27 Kirkham P, Rahman I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther*. 2006;111:476-94.
- 28 Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J*. 1980;191:421-7.
- 29 Davies KJ, Goldberg AL. Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *J Biol Chem*. 1987;262:8227-34.
- 30 Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest*. 1991;21:361-74.

- 31 Castro L, Rodriguez M, Radi R. Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J Biol Chem.* 1994;269:29409-15.
- 32 Berlett BS, Friguet B, Yim MB, Chock PB, Stadtman ER. Peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues in *Escherichia coli* glutamine synthetase mimics adenylation: relevance to signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:1776-80.
- 33 Gow AJ, Duran D, Malcolm S, Ischiropoulos H. Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Lett.* 1996;385:63-6.
- 34 Haddad IY, Pataki G, Hu P, Galliani C, Beckman JS, Matalon S. Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J Clin Invest.* 1994;94:2407-13.
- 35 Kooy NW, Royall JA, Ye YZ, Kelly DR, Beckman JS. Evidence for in vivo peroxynitrite production in human acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;151:1250-4.
- 36 Royall JA, Kooy NW, Beckman JS. Nitric oxide-related oxidants in acute lung injury. *New Horiz.* 1995;3:113-22.
- 37 Reid MB, Haack KE, Franchek KM, Valberg PA, Kobzik L, West MS. Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J Appl Physiol (1985).* 1992;73:1797-804.
- 38 Grounds MD, Yablonka-Reuveni Z. Molecular and cell biology of skeletal muscle regeneration. *Mol Cell Biol Hum Dis Ser.* 1993;3:210-56.
- 39 Gea Guiral J, Barreiro E, Orozco-Levi M. Skeletal Muscle Adaptations to Disease States. In: Bottinelli R, Reggiani C, editors. *Skeletal muscle plasticity in health and disease.* Dordrecht: Springer; 2006. p. 315-60.
- 40 Le Grand F, Rudnicki MA. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19:628-33.
- 41 Coronell C, Orozco-Levi M, Mendez R, Ramirez-Sarmiento A, Galdiz JB, Gea J. Relevance of assessing quadriceps endurance in patients with COPD. *Eur Respir J.* 2004;24:129-36.
- 42 Epstein SK. An overview of respiratory muscle function. *Clin Chest Med.* 1994;15:619-39.
- 43 Simpson K, Killian K, McCartney N, Stubbing DG, Jones NL. Randomised controlled trial of weightlifting exercise in patients with chronic airflow limitation. *Thorax.* 1992;47:70-5.
- 44 Troosters T, Gosselink R, Decramer M. Pulmonary rehabilitation in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *Monaldi Arch Chest Dis.* 1999;54:510-3.
- 45 Stahl E, Jansson SA, Jonsson AC, Svensson K, Lundback B, Andersson F. Health-related quality of life, utility, and productivity outcomes instruments: ease of completion by subjects with COPD. *Health Qual Life Outcomes.* 2003;1:18.
- 46 Gea J, Barreiro E. [Update on the mechanisms of muscle dysfunction in COPD]. *Arch Bronconeumol.* 2008;44:328-37.
- 47 Belcastro AN, Shewchuk LD, Raj DA. Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis. *Mol Cell Biochem.* 1998;179:135-45.
- 48 Reid WD, MacGowan NA. Respiratory muscle injury in animal models and humans. *Mol Cell Biochem.* 1998;179:63-80.
- 49 Tuca Rodriguez A, Calsina-Berna A, Gonzalez-Barboteo J, Gomez-Batiste Alentorn X. [Cancer cachexia]. *Med Clin (Barc).* 2010;135:568-72.
- 50 Evans WJ, Morley JE, Argiles J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, et al. Cachexia: a new definition. *Clin Nutr.* 2008;27:793-9.
- 51 Barreiro E, Gea J. Respiratory and Limb Muscle Dysfunction in COPD. *COPD.* 2014.
- 52 Supinski G, Nethery D, DiMarco A. Effect of free radical scavengers on endotoxin-induced respiratory muscle dysfunction. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148:1318-24.
- 53 Supinski G, Nethery D, Stofan D, DiMarco A. Comparison of the effects of endotoxin on limb, respiratory, and cardiac muscles. *J Appl Physiol (1985).* 1996;81:1370-8.

- 54 Jackson MJ. Molecular mechanisms of muscle damage. *Mol Cell Biol Hum Dis Ser.* 1993;3:257-82.
- 55 Barreiro E, Comtois AS, Gea J, Laubach VE, Hussain SN. Protein tyrosine nitration in the ventilatory muscles: role of nitric oxide synthases. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;26:438-46.
- 56 Barreiro E, Gea J, Di Falco M, Kriazhev L, James S, Hussain SN. Protein carbonyl formation in the diaphragm. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;32:9-17.
- 57 Barreiro E, de la Puente B, Minguella J, Corominas JM, Serrano S, Hussain SN, et al. Oxidative stress and respiratory muscle dysfunction in severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:1116-24.
- 58 Barreiro E, Schols AM, Polkey MI, Galdiz JB, Gosker HR, Swallow EB, et al. Cytokine profile in quadriceps muscles of patients with severe COPD. *Thorax.* 2008;63:100-7.
- 59 Barreiro E. Protein carbonylation and muscle function in COPD and other conditions. *Mass Spectrom Rev.* 2014;33:219-36.
- 60 Rafferty GF, Lou Harris M, Polkey MI, Greenough A, Moxham J. Effect of hypercapnia on maximal voluntary ventilation and diaphragm fatigue in normal humans. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:1567-71.
- 61 Kelsen SG, Ference M, Kapoor S. Effects of prolonged undernutrition on structure and function of the diaphragm. *J Appl Physiol (1985).* 1985;58:1354-9.
- 62 Decramer M, de Bock V, Dom R. Functional and histologic picture of steroid-induced myopathy in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153:1958-64.
- 63 Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961;9:493-5.
- 64 Schultz E, Jaryszak DL, Valliere CR. Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. *Muscle Nerve.* 1985;8:217-22.
- 65 Darr KC, Schultz E. Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985).* 1987;63:1816-21.
- 66 Appell HJ, Forsberg S, Hollmann W. Satellite cell activation in human skeletal muscle after training: evidence for muscle fiber neof ormation. *Int J Sports Med.* 1988;9:297-9.
- 67 Vestbo J, Hurd SS, Agusti AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187:347-65.
- 68 Orozco-Levi M, Garcia-Aymerich J, Villar J, Ramirez-Sarmiento A, Anto JM, Gea J. Wood smoke exposure and risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2006;27:542-6.
- 69 Agusti AG, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2003;21:347-60.
- 70 Evans RA, Morgan MD. The systemic nature of chronic lung disease. *Clin Chest Med.* 2014;35:283-93.
- 71 Maltais F, Decramer M, Casaburi R, Barreiro E, Burelle Y, Debigare R, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: update on limb muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;189:e15-62.
- 72 Creutzberg EC, Wouters EF, Vanderhoven-Augustin IM, Dentener MA, Schols AM. Disturbances in leptin metabolism are related to energy imbalance during acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:1239-45.
- 73 Di Francia M, Barbier D, Mege JL, Orehek J. Tumor necrosis factor-alpha levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;150:1453-5.
- 74 Sauleda J, Garcia-Palmer FJ, Gonzalez G, Palou A, Agusti AG. The activity of cytochrome oxidase is increased in circulating lymphocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and chronic arthritis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:32-5.
- 75 Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev.* 2004;56:515-48.

- 76 Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax*. 2004;59:574-80.
- 77 Barnes PJ. Molecular mechanisms and cellular effects of glucocorticosteroids. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2005;25:451-68.
- 78 Dominguez-Alvarez M, Sabate-Bresco M, Vila-Ubach M, Galdiz JB, Alvarez FJ, Casadevall C, et al. Molecular and physiological events in respiratory muscles and blood of rats exposed to inspiratory threshold loading. *Transl Res*. 2014;163:478-93.
- 79 Supinski G. Free radical induced respiratory muscle dysfunction. *Mol Cell Biochem*. 1998;179:99-110.
- 80 Reid MB, Shoji T, Moody MR, Entman ML. Reactive oxygen in skeletal muscle. II. Extracellular release of free radicals. *J Appl Physiol (1985)*. 1992;73:1805-9.
- 81 Barreiro E, Galdiz JB, Marinan M, Alvarez FJ, Hussain SN, Gea J. Respiratory loading intensity and diaphragm oxidative stress: N-acetyl-cysteine effects. *J Appl Physiol (1985)*. 2006;100:555-63.
- 82 Barreiro E, Hussain SN. [Respiratory muscle failure in sepsis]. *Arch Bronconeumol*. 2002;38:226-35.
- 83 Hill AT, Campbell EJ, Hill SL, Bayley DL, Stockley RA. Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis. *Am J Med*. 2000;109:288-95.
- 84 Martinez-Llorens JM, Orozco-Levi M, Masdeu MJ, Coronell C, Ramirez-Sarmiento A, Sanjuas C, et al. [Global muscle dysfunction and exacerbation of COPD: a cohort study]. *Med Clin (Barc)*. 2004;122:521-7.
- 85 Gea J, Casadevall C, Pascual S, Orozco-Levi M, Barreiro E. Respiratory diseases and muscle dysfunction. *Expert Rev Respir Med*. 2012;6:75-90.
- 86 Caron MA, Debigare R, Dekhuijzen PN, Maltais F. Comparative assessment of the quadriceps and the diaphragm in patients with COPD. *J Appl Physiol (1985)*. 2009;107:952-61.
- 87 Goldman MD, Grassino A, Mead J, Sears TA. Mechanics of the human diaphragm during voluntary contraction: dynamics. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1978;44:840-8.
- 88 Gea J, Orozco-Levi M, Barreiro E, Ferrer A, Broquetas J. Structural and functional changes in the skeletal muscles of COPD patients: the "compartments" theory. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2001;56:214-24.
- 89 Orozco-Levi M, Gea Guiral J. [Muscle changes in chronic obstructive pulmonary disease: the theory of compartments]. *Arch Bronconeumol*. 2000;36:95-102.
- 90 Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154:1055-60.
- 91 Schols AM. Nutrition in chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med*. 2000;6:110-5.
- 92 Vestbo J, Anderson W, Coxson HO, Crim C, Dawber F, Edwards L, et al. Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate End-points (ECLIPSE). *Eur Respir J*. 2008;31:869-73.
- 93 Agusti A, Edwards LD, Rennard SI, MacNee W, Tal-Singer R, Miller BE, et al. Persistent systemic inflammation is associated with poor clinical outcomes in COPD: a novel phenotype. *PLoS One*. 2012;7:e37483.
- 94 Gea J, Agusti A, Roca J. Pathophysiology of muscle dysfunction in COPD. *J Appl Physiol (1985)*. 2013;114:1222-34.
- 95 Remels AH, Gosker HR, Langen RC, Schols AM. The mechanisms of cachexia underlying muscle dysfunction in COPD. *J Appl Physiol (1985)*. 2013;114:1253-62.
- 96 Orozco-Levi M, Gea J, Lloreta JL, Felez M, Minguella J, Serrano S, et al. Subcellular adaptation of the human diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 1999;13:371-8.
- 97 Lloreta J, Orozco M, Gea J, Corominas JM, Serrano S. Selective diaphragmatic mitochondrial abnormalities in a patient with marked air flow obstruction. *Ultrastruct Pathol*. 1996;20:67-71.

- 98** Gea JG. Myosin gene expression in the respiratory muscles. *Eur Respir J*. 1997;10:2404-10.
- 99** Levine S, Nguyen T, Friscia M, Zhu J, Szeto W, Kucharczuk JC, et al. Parasternal intercostal muscle remodeling in severe chronic obstructive pulmonary disease. *J Appl Physiol* (1985). 2006;101:1297-302.
- 100** Montes de Oca M, Rassulo J, Celli BR. Respiratory muscle and cardiopulmonary function during exercise in very severe COPD. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154:1284-9.
- 101** Montes de Oca M, Celli BR. Respiratory muscle recruitment and exercise performance in eucapnic and hypercapnic severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:880-5.
- 102** Gosselink R, Troosters T, Decramer M. Peripheral muscle weakness contributes to exercise limitation in COPD. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153:976-80.
- 103** Serres I, Gautier V, Varray A, Prefaut C. Impaired skeletal muscle endurance related to physical inactivity and altered lung function in COPD patients. *Chest*. 1998;113:900-5.
- 104** Bernard S, LeBlanc P, Whittom F, Carrier G, Jobin J, Belleau R, et al. Peripheral muscle weakness in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:629-34.
- 105** Engelen MP, Schols AM, Does JD, Gosker HR, Deutz NE, Wouters EF. Exercise-induced lactate increase in relation to muscle substrates in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:1697-704.
- 106** Decramer M, Lacquet LM, Fagard R, Rogiers P. Corticosteroids contribute to muscle weakness in chronic airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;150:11-6.
- 107** Gosselink R, Troosters T, Decramer M. Distribution of muscle weakness in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *J Cardiopulm Rehabil*. 2000;20:353-60.
- 108** Schols AM, Mostert R, Soeters PB, Wouters EF. Body composition and exercise performance in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 1991;46:695-9.
- 109** Wuyam B, Payen JF, Levy P, Bensaidane H, Reutenauer H, Le Bas JF, et al. Metabolism and aerobic capacity of skeletal muscle in chronic respiratory failure related to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 1992;5:157-62.
- 110** Jobin J, Maltais F, Doyon JF, LeBlanc P, Simard PM, Simard AA, et al. Chronic obstructive pulmonary disease: capillarity and fiber-type characteristics of skeletal muscle. *J Cardiopulm Rehabil*. 1998;18:432-7.
- 111** Whittom F, Jobin J, Simard PM, Leblanc P, Simard C, Bernard S, et al. Histochemical and morphological characteristics of the vastus lateralis muscle in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Med Sci Sports Exerc*. 1998;30:1467-74.
- 112** Hughes RL, Katz H, Sahgal V, Campbell JA, Hartz R, Shields TW. Fiber size and energy metabolites in five separate muscles from patients with chronic obstructive lung diseases. *Respiration*. 1983;44:321-8.
- 113** Satta A, Migliori GB, Spanevello A, Neri M, Bottinelli R, Canepari M, et al. Fibre types in skeletal muscles of chronic obstructive pulmonary disease patients related to respiratory function and exercise tolerance. *Eur Respir J*. 1997;10:2853-60.
- 114** Maltais F, Jobin J, Sullivan MJ, Bernard S, Whittom F, Killian KJ, et al. Metabolic and hemodynamic responses of lower limb during exercise in patients with COPD. *J Appl Physiol* (1985). 1998;84:1573-80.
- 115** Sala E, Roca J, Marrades RM, Alonso J, Gonzalez De Suso JM, Moreno A, et al. Effects of endurance training on skeletal muscle bioenergetics in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:1726-34.
- 116** Gea Guiral J, Orozco-Levi M, Barreiro E. Skeletal and Respiratory Muscle Dysfunction in the Systemic Inflammatory Response Syndrome associated with COPD. In: Cazzola M, Wouters EF, Stockley RA, editors. *COPD as a Systemic Disease: Clinical Publishing*; 2007.

- 117** Nici L, Limberg T, Hilling L, Garvey C, Normandin EA, Reardon J, et al. Clinical Competency Guidelines for Pulmonary Rehabilitation Professionals: American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation Position Statement. *J Cardiopulm Rehabil Prev.* 2007;27:355-8.
- 118** Bloomfield SA. Changes in musculoskeletal structure and function with prolonged bed rest. *Med Sci Sports Exerc.* 1997;29:197-206.
- 119** Spruit MA, Gosselink R, Troosters T, De Paepe K, Decramer M. Resistance versus endurance training in patients with COPD and peripheral muscle weakness. *Eur Respir J.* 2002;19:1072-8.
- 120** Gray-Donald K, Gibbons L, Shapiro SH, Macklem PT, Martin JG. Nutritional status and mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153:961-6.
- 121** Landbo C, Prescott E, Lange P, Vestbo J, Almdal TP. Prognostic value of nutritional status in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:1856-61.
- 122** Schols AM, Broekhuizen R, Weling-Scheepers CA, Wouters EF. Body composition and mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr.* 2005;82:53-9.
- 123** Vestbo J, Prescott E, Almdal T, Dahl M, Nordestgaard BG, Andersen T, et al. Body mass, fat-free body mass, and prognosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease from a random population sample: findings from the Copenhagen City Heart Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173:79-83.
- 124** Swallow EB, Reyes D, Hopkinson NS, Man WD, Porcher R, Cetti EJ, et al. Quadriceps strength predicts mortality in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2007;62:115-20.
- 125** Debigare R, Cote CH, Maltais F. Peripheral muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease. Clinical relevance and mechanisms. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:1712-7.
- 126** Coronell C, Orozco-Levi M, Gea J. COPD and body weight in a Mediterranean population. *Clin Nutr.* 2002;21:437; author reply -8.
- 127** Vermeeren MA, Creutzberg EC, Schols AM, Postma DS, Pieters WR, Roldaan AC, et al. Prevalence of nutritional depletion in a large out-patient population of patients with COPD. *Respir Med.* 2006;100:1349-55.
- 128** Agustí AG, Sauleda J, Miralles C, Gomez C, Togores B, Sala E, et al. Skeletal muscle apoptosis and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:485-9.
- 129** Barreiro E, Ferrer D, Sanchez F, Minguella J, Marin-Corral J, Martinez-Llorens J, et al. Inflammatory cells and apoptosis in respiratory and limb muscles of patients with COPD. *J Appl Physiol (1985).* 2011;111:808-17.
- 130** Sartorelli V, Fulco M. Molecular and cellular determinants of skeletal muscle atrophy and hypertrophy. *Sci STKE.* 2004;2004:re11.
- 131** Theriault ME, Pare ME, Maltais F, Debigare R. Satellite cells senescence in limb muscle of severe patients with COPD. *PLoS One.* 2012;7:e39124.
- 132** Theriault ME, Pare ME, Lemire BB, Maltais F, Debigare R. Regenerative defect in vastus lateralis muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res.* 2014;15:35.
- 133** Pomies P, Rodriguez J, Blaquiere M, Sedraoui S, Gouzi F, Carnac G, et al. Reduced myotube diameter, atrophic signalling and elevated oxidative stress in cultured satellite cells from COPD patients. *J Cell Mol Med.* 2015;19:175-86.
- 134** Zhu E, Petrof BJ, Gea J, Comtois N, Grassino AE. Diaphragm muscle fiber injury after inspiratory resistive breathing. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;155:1110-6.
- 135** Orozco-Levi M, Lloreta J, Minguella J, Serrano S, Broquetas JM, Gea J. Injury of the human diaphragm associated with exertion and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:1734-9.
- 136** McCool FD, Tzelepis GE. Inspiratory muscle training in the patient with neuromuscular disease. *Phys Ther.* 1995;75:1006-14.
- 137** Reid WD, Samrai B. Respiratory muscle training for patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Phys Ther.* 1995;75:996-1005.

- 138** Jakobsson P, Jorfeldt L, Brundin A. Skeletal muscle metabolites and fibre types in patients with advanced chronic obstructive pulmonary disease (COPD), with and without chronic respiratory failure. *Eur Respir J*. 1990;3:192-6.
- 139** Jakobsson P, Jorfeldt L, Henriksson J. Metabolic enzyme activity in the quadriceps femoris muscle in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151:374-7.
- 140** Oga T, Nishimura K, Tsukino M, Sato S, Hajiro T. Analysis of the factors related to mortality in chronic obstructive pulmonary disease: role of exercise capacity and health status. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:544-9.
- 141** Celli BR, Cote CG, Marin JM, Casanova C, Montes de Oca M, Mendez RA, et al. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004;350:1005-12.
- 142** Pinto-Plata VM, Cote C, Cabral H, Taylor J, Celli BR. The 6-min walk distance: change over time and value as a predictor of survival in severe COPD. *Eur Respir J*. 2004;23:28-33.
- 143** Medinas-Amoros M, Alorda C, Renom F, Rubi M, Centeno J, Ferrer V, et al. Quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease: the predictive validity of the BODE index. *Chron Respir Dis*. 2008;5:7-11.
- 144** Ong KC, Earnest A, Lu SJ. A multidimensional grading system (BODE index) as predictor of hospitalization for COPD. *Chest*. 2005;128:3810-6.
- 145** Alonso J, Prieto L, Anto JM. [The Spanish version of the SF-36 Health Survey (the SF-36 health questionnaire): an instrument for measuring clinical results]. *Med Clin (Barc)*. 1995;104:771-6.
- 146** Ferrer M, Alonso J, Prieto L, Plaza V, Monso E, Marrades R, et al. Validity and reliability of the St George's Respiratory Questionnaire after adaptation to a different language and culture: the Spanish example. *Eur Respir J*. 1996;9:1160-6.
- 147** Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J*. 1977;1:1645-8.
- 148** Burrows B, Earle RH. Prediction of survival in patients with chronic airway obstruction. *Am Rev Respir Dis*. 1969;99:865-71.
- 149** Traver GA, Cline MG, Burrows B. Predictors of mortality in chronic obstructive pulmonary disease. A 15-year follow-up study. *Am Rev Respir Dis*. 1979;119:895-902.
- 150** Anthonisen NR, Wright EC, Hodgkin JE. Prognosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis*. 1986;133:14-20.
- 151** Anthonisen NR. Prognosis in chronic obstructive pulmonary disease: results from multicenter clinical trials. *Am Rev Respir Dis*. 1989;140:S95-9.
- 152** Tantucci C, Donati P, Nicosia F, Bertella E, Redolfi S, De Vecchi M, et al. Inspiratory capacity predicts mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2008;102:613-9.
- 153** Menezes AM, Perez-Padilla R, Wehrmeister FC, Lopez-Varela MV, Muino A, Valdivia G, et al. FEV1 is a better predictor of mortality than FVC: the PLATINO cohort study. *PLoS One*. 2014;9:e109732.
- 154** Vestbo J, Lange P. Natural history of COPD: Focusing on change in FEV. *Respirology*. 2015.
- 155** Casanova C, Cote C, de Torres JP, Aguirre-Jaime A, Marin JM, Pinto-Plata V, et al. Inspiratory-to-total lung capacity ratio predicts mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:591-7.
- 156** Casanova C, Cote C, Marin JM, Pinto-Plata V, de Torres JP, Aguirre-Jaime A, et al. Distance and oxygen desaturation during the 6-min walk test as predictors of long-term mortality in patients with COPD. *Chest*. 2008;134:746-52.
- 157** French A, Balfe D, Mirocha JM, Falk JA, Mosenifar Z. The inspiratory capacity/total lung capacity ratio as a predictor of survival in an emphysematous phenotype of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015;10:1305-12.

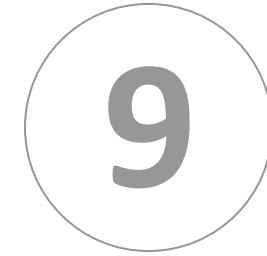


- 158 Marin JM, Carrizo SJ, Gascon M, Sanchez A, Gallego B, Celli BR. Inspiratory capacity, dynamic hyperinflation, breathlessness, and exercise performance during the 6-minute-walk test in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:1395-9.
- 159 Albuquerque AL, Nery LE, Villaca DS, Machado TY, Oliveira CC, Paes AT, et al. Inspiratory fraction and exercise impairment in COPD patients GOLD stages II-III. *Eur Respir J*. 2006;28:939-44.
- 160 Vassaux C, Torre-Bouscoulet L, Zeineldine S, Cortopassi F, Paz-Diaz H, Celli BR, et al. Effects of hyperinflation on the oxygen pulse as a marker of cardiac performance in COPD. *Eur Respir J*. 2008;32:1275-82.
- 161 Dajczman E, Wardini R, Kasymjanova G, Prefontaine D, Baltzan MA, Wolkove N. Six minute walk distance is a predictor of survival in patients with chronic obstructive pulmonary disease undergoing pulmonary rehabilitation. *Can Respir J*. 2015;22:225-9.
- 162 Soler-Cataluna JJ, Martinez-Garcia MA, Roman Sanchez P, Salcedo E, Navarro M, Ochando R. Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2005;60:925-31.
- 163 Fan VS, Curtis JR, Tu SP, McDonnell MB, Fihn SD, Ambulatory Care Quality Improvement Project I. Using quality of life to predict hospitalization and mortality in patients with obstructive lung diseases. *Chest*. 2002;122:429-36.
- 164 Nishimura K, Izumi T, Tsukino M, Oga T. Dyspnea is a better predictor of 5-year survival than airway obstruction in patients with COPD. *Chest*. 2002;121:1434-40.
- 165 Chailleux E, Laaban JP, Veale D. Prognostic value of nutritional depletion in patients with COPD treated by long-term oxygen therapy: data from the AN-TADIR observatory. *Chest*. 2003;123:1460-6.
- 166 Marquis K, Debigare R, Lacasse Y, LeBlanc P, Jobin J, Carrier G, et al. Mid thigh muscle cross-sectional area is a better predictor of mortality than body mass index in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:809-13.
- 167 Kasapis C, Thompson PD. The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1563-9.
- 168 Garrod R, Ansley P, Canavan J, Jewell A. Exercise and the inflammatory response in chronic obstructive pulmonary disease (COPD)--Does training confer anti-inflammatory properties in COPD? *Med Hypotheses*. 2007;68:291-8.
- 169 Spruit MA, Gosselink R, Troosters T, Kasran A, Van Vliet M, Decramer M. Low-grade systemic inflammation and the response to exercise training in patients with advanced COPD. *Chest*. 2005;128:3183-90.
- 170 Rabinovich RA, Ardite E, Troosters T, Carbo N, Alonso J, Gonzalez de Suso JM, et al. Reduced muscle redox capacity after endurance training in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:1114-8.
- 171 Rabinovich RA, Ardite E, Mayer AM, Polo MF, Vilaro J, Argiles JM, et al. Training depletes muscle glutathione in patients with chronic obstructive pulmonary disease and low body mass index. *Respiration*. 2006;73:757-61.
- 172 Barreiro E, Rabinovich R, Marin-Corral J, Barbera JA, Gea J, Roca J. Chronic endurance exercise induces quadriceps nitrosative stress in patients with severe COPD. *Thorax*. 2009;64:13-9.
- 173 Rodriguez DA, Kalko S, Puig-Vilanova E, Perez-Olabarria M, Falciani F, Gea J, et al. Muscle and blood redox status after exercise training in severe COPD patients. *Free Radic Biol Med*. 2012;52:88-94.
- 174 Ramirez-Sarmiento A, Orozco-Levi M, Guell R, Barreiro E, Hernandez N, Mota S, et al. Inspiratory muscle training in patients with chronic obstructive pulmonary disease: structural adaptation and physiologic outcomes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:1491-7.
- 175 Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. *Chest*. 2009;136:e28.

- 176** Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001;29:1303-10.
- 177** Esteban A, Frutos-Vivar F, Ferguson ND, Penuelas O, Lorente JA, Gordo F, et al. Sepsis incidence and outcome: contrasting the intensive care unit with the hospital ward. *Crit Care Med.* 2007;35:1284-9.
- 178** Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003;348:138-50.
- 179** Beutler B, Milsark IW, Cerami AC. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science.* 1985;229:869-71.
- 180** Martin TR. Cytokines and the acute respiratory distress syndrome (ARDS): a question of balance. *Nat Med.* 1997;3:272-3.
- 181** Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J. Bacteremia and severe sepsis in adults: a multicenter prospective survey in ICUs and wards of 24 hospitals. French Bacteremia-Sepsis Study Group. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154:617-24.
- 182** Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med.* 1993;119:771-8.
- 183** Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, Pittet D, Ricou B, Grau GE, et al. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:396-402.
- 184** Reinhart K, Menges T, Gardlund B, Harm Zwaveling J, Smithes M, Vincent JL, et al. Randomized, placebo-controlled trial of the anti-tumor necrosis factor antibody fragment afelimomab in hyperinflammatory response during severe sepsis: The RAMSES Study. *Crit Care Med.* 2001;29:765-9.
- 185** Boczkowski J, Lisdero CL, Lanone S, Samb A, Carreras MC, Boveris A, et al. Endogenous peroxynitrite mediates mitochondrial dysfunction in rat diaphragm during endotoxemia. *FASEB J.* 1999;13:1637-46.
- 186** Barreiro E, Comtois AS, Mohammed S, Lands LC, Hussain SN. Role of heme oxygenases in sepsis-induced diaphragmatic contractile dysfunction and oxidative stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;283:L476-84.
- 187** Lanone S, Mebazaa A, Heymes C, Henin D, Poderoso JJ, Panis Y, et al. Muscular contractile failure in septic patients: role of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:2308-15.
- 188** Friedrich O. Critical illness myopathy: sepsis-mediated failure of the peripheral nervous system. *Eur J Anaesthesiol Suppl.* 2008;42:73-82.
- 189** Burke JF, Pontoppidan H, Welch CE. High Output Respiratory Failure: An Important Cause of Death Ascribed to Peritonitis or Ileus. *Ann Surg.* 1963;158:581-95.
- 190** Friman G. Effect of acute infectious disease on isometric muscle strength. *Scand J Clin Lab Invest.* 1977;37:303-8.
- 191** Hussain SN. Respiratory muscle dysfunction in sepsis. *Mol Cell Biochem.* 1998;179:125-34.
- 192** Le Bourdelles G, Viires N, Boczkowski J, Seta N, Pavlovic D, Aubier M. Effects of mechanical ventilation on diaphragmatic contractile properties in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;149:1539-44.
- 193** Roca J, Sanchis J, Agusti-Vidal A, Segarra F, Navajas D, Rodriguez-Roisin R, et al. Spirometric reference values from a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir.* 1986;22:217-24.
- 194** Roca J, Rodriguez-Roisin R, Cobo E, Burgos F, Perez J, Clausen JL. Single-breath carbon monoxide diffusing capacity prediction equations from a Mediterranean population. *Am Rev Respir Dis.* 1990;141:1026-32.
- 195** Roca J, Burgos F, Barbera JA, Sunyer J, Rodriguez-Roisin R, Castellsague J, et al. Prediction equations for plethysmographic lung volumes. *Respir Med.* 1998;92:454-60.
- 196** Laboratories ATSCoPSfCPF. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:111-7.

- 197** Macgowan NA, Evans KG, Road JD, Reid WD. Diaphragm injury in individuals with airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:1654-9.
- 198** Nocentini S, Reginensi D, Garcia S, Carulla P, Moreno-Flores MT, Wandosell F, et al. Myelin-associated proteins block the migration of olfactory ensheathing cells: an in vitro study using single-cell tracking and traction force microscopy. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69:1689-703.
- 199** Gosker HR, Zeegers MP, Wouters EF, Schols AM. Muscle fibre type shifting in the vastus lateralis of patients with COPD is associated with disease severity: a systematic review and meta-analysis. *Thorax.* 2007;62:944-9.
- 200** Vogiatzis I, Terzis G, Stratakos G, Cherouveim E, Athanasopoulos D, Spetsioti S, et al. Effect of pulmonary rehabilitation on peripheral muscle fiber remodeling in patients with COPD in GOLD stages II to IV. *Chest.* 2011;140:744-52.
- 201** Puig-Vilanova E, Martinez-Llorens J, Ausin P, Roca J, Gea J, Barreiro E. Quadriceps muscle weakness and atrophy are associated with a differential epigenetic profile in advanced COPD. *Clin Sci (Lond).* 2015;128(12):905-21.
- 202** Casadevall C, Coronell C, Ramirez-Sarmiento AL, Martinez-Llorens J, Barreiro E, Orozco-Levi M, et al. Upregulation of pro-inflammatory cytokines in the intercostal muscles of COPD patients. *Eur Respir J.* 2007;30:701-7.
- 203** Bustamante V, Casanova J, Lopez de Santamaria E, Mas S, Sellares J, Gea J, et al. Redox balance following magnetic stimulation training in the quadriceps of patients with severe COPD. *Free Radic Res.* 2008;42:939-48.
- 204** Casadevall C, Coronell C, Ausin P, Martinez-Llorens J, Orozco-Levi M, Barreiro E, et al. [Inflammatory cytokines and repair factors in the intercostal muscles of patients with severe COPD]. *Arch Bronconeumol.* 2009;45:279-85.
- 205** Marin-Corral J, Minguella J, Ramirez-Sarmiento AL, Hussain SN, Gea J, Barreiro E. Oxidised proteins and superoxide anion production in the diaphragm of severe COPD patients. *Eur Respir J.* 2009;33:1309-19.
- 206** Fermoselle C, Rabinovich R, Ausin P, Puig-Vilanova E, Coronell C, Sanchez F, et al. Does oxidative stress modulate limb muscle atrophy in severe COPD patients? *Eur Respir J.* 2012;40:851-62.
- 207** Orozco-Levi M, Coronell C, Ramirez-Sarmiento A, Lloreta J, Martinez-Llorens J, Galdiz JB, et al. Injury of peripheral muscles in smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Ultrastruct Pathol.* 2012;36:228-38.
- 208** Barreiro E, Fermoselle C, Mateu-Jimenez M, Sanchez-Font A, Pijuan L, Gea J, et al. Oxidative stress and inflammation in the normal airways and blood of patients with lung cancer and COPD. *Free Radic Biol Med.* 2013;65:859-71.
- 209** Barreiro E, Sznajder JJ. Epigenetic regulation of muscle phenotype and adaptation: a potential role in COPD muscle dysfunction. *J Appl Physiol (1985).* 2013;114:1263-72.
- 210** Puig-Vilanova E, Rodriguez DA, Lloreta J, Ausin P, Pascual-Guardia S, Broquetas J, et al. Oxidative stress, redox signaling pathways, and autophagy in cachectic muscles of male patients with advanced COPD and lung cancer. *Free Radic Biol Med.* 2015;79:91-108.
- 211** Barreiro E, Sieck G. Muscle dysfunction in COPD. *J Appl Physiol (1985).* 2013;114:1220-1.
- 212** Seymour JM, Ward K, Sidhu PS, Puthuchery Z, Steier J, Jolley CJ, et al. Ultrasound measurement of rectus femoris cross-sectional area and the relationship with quadriceps strength in COPD. *Thorax.* 2009;64:418-23.
- 213** Natanek SA, Gosker HR, Slot IG, Marsh GS, Hopkinson NS, Man WD, et al. Heterogeneity of quadriceps muscle phenotype in chronic obstructive pulmonary disease (COPD); implications for stratified medicine? *Muscle Nerve.* 2013;48:488-97.
- 214** Montes de Oca M, Torres SH, Gonzalez Y, Romero E, Hernandez N, Talamo C. [Changes in exercise tolerance, health related quality of life, and peripheral muscle characteristics of chronic obstructive pulmonary disease patients after 6 weeks' training]. *Arch Bronconeumol.* 2005;41:413-8.
- 215** Degens H, Sanchez Horneros JM, Heijdra YF, Dekhuijzen PN, Hopman MT. Skeletal muscle contractility is preserved in COPD patients with normal fat-free mass. *Acta Physiol Scand.* 2005;184:235-42.

- 216 Vanfleteren LE, Spruit MA, Groenen M, Gaffron S, van Empel VP, Bruijnzeel PL, et al. Clusters of comorbidities based on validated objective measurements and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187:728-35.
- 217 Levine S, Nguyen T, Taylor N, Friscia ME, Budak MT, Rothenberg P, et al. Rapid disuse atrophy of diaphragm fibers in mechanically ventilated humans. *N Engl J Med.* 2008;358:1327-35.
- 218 Hansen MJ, Gualano RC, Bozinovski S, Vlahos R, Anderson GP. Therapeutic prospects to treat skeletal muscle wasting in COPD (chronic obstructive lung disease). *Pharmacol Ther.* 2006;109:162-72.
- 219 Gosker HR, Kubat B, Schaart G, van der Vusse GJ, Wouters EF, Schols AM. Myopathological features in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2003;22:280-5.
- 220 Plant PJ, Brooks D, Faughnan M, Bayley T, Bain J, Singer L, et al. Cellular markers of muscle atrophy in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;42:461-71.
- 221 Constantin D, Menon MK, Houchen-Wolloff L, Morgan MD, Singh SJ, Greenhaff P, et al. Skeletal muscle molecular responses to resistance training and dietary supplementation in COPD. *Thorax.* 2013;68:625-33.
- 222 Maes K, Stamiris A, Thomas D, Cielen N, Smuder A, Powers SK, et al. Effects of controlled mechanical ventilation on sepsis-induced diaphragm dysfunction in rats. *Crit Care Med.* 2014;42:e772-82.
- 223 Turan N, Kalko S, Stincone A, Clarke K, Sabah A, Howlett K, et al. A systems biology approach identifies molecular networks defining skeletal muscle abnormalities in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS Comput Biol.* 2011;7:e1002129.
- 224 Casadevall C, Pascual-Guardia S, Barreiro B, Gea Guiral J. Serum from patients with COPD exacerbations attenuates differentiation of quadriceps muscle precursor cells. *Monogr Arch Bronconeumol.* 2015;2:68.
- 225 Clemmons DR. Role of IGF-I in skeletal muscle mass maintenance. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20:349-56.
- 226 Comtois AS, Barreiro E, Huang PL, Marette A, Perrault M, Hussain SN. Lipopolysaccharide-induced diaphragmatic contractile dysfunction and sarcolemmal injury in mice lacking the neuronal nitric oxide synthase. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:977-82.
- 227 Crul T, Spruit MA, Gayan-Ramirez G, Quarck R, Gosselink R, Troosters T, et al. Markers of inflammation and disuse in vastus lateralis of chronic obstructive pulmonary disease patients. *Eur J Clin Invest.* 2007;37(11):897-904.
- 228 Debigare R, Maltais F, Cote CH, Michaud A, Caron MA, Mofarrahi M, et al. Profiling of mRNA expression in quadriceps of patients with COPD and muscle wasting. *COPD.* 2008;5:75-84.
- 229 Lewis A, Riddoch-Contreras J, Natanek SA, Donaldson A, Man WD, Moxham J, et al. Downregulation of the serum response factor/miR-1 axis in the quadriceps of patients with COPD. *Thorax.* 2012;67:26-34.
- 230 Ruff RL, Secrist D. Inhibitors of prostaglandin synthesis or cathepsin B prevent muscle wasting due to sepsis in the rat. *J Clin Invest.* 1984;73:1483-6.
- 231 Shefer G, Benayahu D. The effect of exercise on IGF-I on muscle fibers and satellite cells. *Front Biosci (Elite Ed).* 2012;4:230-9.
- 232 Ten Broek RW, Grefte S, Von den Hoff JW. Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration. *J Cell Physiol.* 2010;224:7-16.
- 233 Vogiatzis I, Simoes DC, Stratakos G, Kourepini E, Terzis G, Manta P, et al. Effect of pulmonary rehabilitation on muscle remodelling in cachectic patients with COPD. *Eur Respir J.* 2010;36:301-10.



# Addendum

## 9. Addendum

Aprovechando la revisión bibliográfica realizada para la introducción de la presente Tesis Doctoral, se ha aceptado para su publicación en 2015 el artículo de revisión titulado “*Muscle dysfunction in COPD: Update on causes and biological findings*”

Gea J, Pascual S, Casadevall C, Orozco-Levi M, Barreiro E. [Muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: update on causes and biological findings](#). J Thorac Dis. 2015 Oct;7(10):E418-E438

