

Expresión de los genes de la interleucina 10 (IL-10) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en músculos respiratorios y periféricos. Relación con el daño sarcolémico

J. Palacio^a, J.B. Gáldiz^b, J.J. Bech^c, M. Mariñán^b, C. Casadevall^a, P. Martínez^c y J. Gea^a

^aServicio de Neumología. Unidad de Investigación Respiratoria y Ambiental. Hospital del Mar. IMIM. Fisiopatología (CEXS). Universitat Pompeu Fabra. Barcelona. ^bServicio de Neumología. Hospital de Cruces. Universidad del País Vasco. Bilbao. ^cUnidad de Inmunología. Instituto de Biotecnología y Biomedicina. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona.

ANTECEDENTES: El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) se ha implicado en la pérdida de masa muscular en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y otras enfermedades consumptivas. Su producción estaría en relación con la inflamación derivada de la propia enfermedad pulmonar o el hábito tabáquico, llegando al músculo por el torrente sanguíneo. Sin embargo, también se ha sugerido que el TNF- α podría expresarse directamente en el tejido muscular. Sea cual fuere el lugar de producción, la relación del TNF- α con el daño muscular subsiguiente no es clara.

OBJETIVO: Hemos estudiado la expresión del TNF- α y una interleucina inhibidora de su producción (IL-10) en los músculos respiratorios principales y en un músculo periférico del perro.

MÉTODOS: Se han incluido nueve animales machos, adultos jóvenes de raza Beagle. En todos ellos se tomaron biopsias del diafragma (Df), del intercostal externo (IExt) y de un músculo de las extremidades (vasto interno del cuádriceps o VInt). Se analizó la expresión de los genes de TNF- α e IL-10, a través de la determinación de sus ARNm correspondientes, utilizando la transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). También se evaluó el daño sarcolémico mediante detección de fibronectina intracelular (inmunohistoquímica).

RESULTADOS: Los valores de expresión de ambas citocinas evidenciaron una amplia dispersión interindividual. Por un lado, la expresión de TNF- α fue mínima en Df e IExt (respectivamente, $0,02 \pm 0,03$ y $0,05 \pm 0,06$ u.a.), con valores relativamente elevados en VInt ($0,14 \pm 0,08$ u.a.). A su vez, la IL-10 evidenciaba valores bajos en Df ($0,6 \pm 0,5$ u.a.), que eran algo superiores en IExt ($2,7 \pm 1,9$ u.a.; $p < 0,01$) y VInt ($1,6 \pm 1,7$ u.a.). El daño sarcolémico era mínimo en los tres músculos y se relacionaba con la expresión de TNF- α en el músculo periférico ($r = 0,682$; $p < 0,05$).

CONCLUSIONES: a) TNF- α e IL-10 parecen expresarse constitutivamente en el músculo esquelético canino; b) los valores basales de expresión del TNF- α son menores en los músculos respiratorios que en los de las extremidades mostrando relación en estos últimos con el daño de membrana.

Palabras clave: Músculos respiratorios. Músculos periféricos. Citocinas.

Interleukin 10 and tumor necrosis factor alpha gene expression in respiratory and peripheral muscles. Relation to sarcolemmal damage

BACKGROUND: Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) has been implicated in loss of muscle mass in chronic obstructive pulmonary disease and other consumptive processes. TNF- α production would be related to inflammation arising from pulmonary disease itself or, alternatively, from smoking, and would be carried to the muscle through the blood stream. However, it has also been suggested that TNF- α may be expressed directly in muscle tissue. Regardless the site of production of TNF- α , its relation to subsequent muscle damage is unclear.

OBJECTIVE: We studied the expression of TNF- α and an interleukin inhibitor of its production (IL-10) in the main respiratory muscles and a peripheral muscle in the dog.

METHOD: Nine young, male Beagle dogs were included. From all animals we obtained a biopsy of the diaphragm (Dph) and external intercostal (ExtI) muscles and a leg muscle (internal vastus of the quadriceps, IntV). TNF- α and IL-10 gene expressions were measured through the analysis of messenger RNA levels, using reverse transcription and polymerase chain reaction. We also assessed sarcolemmal damage using intracellular fibronectin detection (immunohistochemistry).

RESULTS: The expression of both cytokines showed wide interindividual variability. On the one hand, TNF- α (was very low in Dph and ExtI ($0,02 \pm 0,03$ and $0,05 \pm 0,06$ a.u., respectively), but relatively high in the IntV ($0,14 \pm 0,08$ a.u.). IL-10 expression, on the other hand was low in the Dph ($0,06 \pm 0,05$ a.u.) and slightly higher in the ExtI ($2,7 \pm 1,9$ a.u., $p < 0,01$) and IntV ($1,6 \pm 1,7$ a.u.). Sarcolemmal damage was minimal in all three muscles and was related to TNF- α expression in the peripheral muscle ($r = 0,682$, $p < 0,05$).

CONCLUSIONS: 1) TNF- α and IL-10 appear to be constitutively expressed within the skeletal muscle in dogs. 2) Basal TNF- α expression is lower in respiratory muscles than in peripheral muscles. 3) The expression in the latter is related to membrane damage.

Key words: Respiratory Muscles. Peripheral Muscles. Cytokines.

Introducción

Uno de los síntomas más prominentes que presentan muchos pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una disminución en su capacidad de ejercicio¹. Aunque tradicionalmente esta limitación se ha

Este trabajo ha sido subvencionado por BIOMED (UE) BMH4-CT98-3406, SEPAR 98 y FIS 98.

Correspondencia: Dr. J. Gea.
Servicio de Neumología. Hospital del Mar.
P.º Marítim, 27. 08003 Barcelona.
Correo electrónico: jgea@imim.es

atribuido a causas ventilatorias, cada vez existe mayor evidencia de la implicación de los músculos esqueléticos, tanto respiratorios como de las extremidades². Ambos grupos musculares se verían sometidos a las influencias de factores locales (p. ej., el grado de actividad) y generales (p. ej., las alteraciones nutricionales y la inflamación), que acabarían condicionando su fenotipo^{3,4}. La inflamación sería fruto del propio proceso pulmonar o del hábito tabáquico, y conduciría a efectos “a distancia” en otros órganos del individuo⁵. Entre los mediadores inflamatorios que se han postulado como responsables de los cambios estructurales musculares (p. ej., el daño de membrana), se halla el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)^{3,6}. Esta citocina se halla aumentada en el torrente sanguíneo de algunos pacientes con EPOC^{6,7}. Sin embargo, trabajos recientes sugieren que el TNF- α podría estar sintetizado también en el propio tejido muscular⁸. De confirmarse esta posibilidad, probablemente sería más relevante para explicar la fisiopatología de la disfunción muscular en la EPOC que el mencionado aumento sistémico del TNF- α , ya que en general, las citocinas tienen un efecto más autocrino o paracrino (local) que endocrino (a distancia). Por otra parte, el daño de membrana parece ser uno de los primeros eventos en el proceso de remodelación de los músculos esqueléticos como respuesta a diferentes estímulos⁹. El objetivo de este trabajo es triple: en primer lugar, investigar si existe expresión constitutiva (basal) del gen del TNF- α en los músculos respiratorios y periféricos; en segundo lugar, estudiar la expresión de uno de los mayores inhibidores del TNF- α , la interleucina 10 (IL-10), analizando su papel regulador *in vivo* y en situación basal, y por último evaluar si existe relación entre la expresión del TNF- α y uno de los principales marcadores de lesión celular, el daño de membrana.

Métodos

Población

Se incluyeron en el estudio nueve perros adultos jóvenes, machos de raza Beagle. El presente protocolo fue aprobado por los comités éticos de nuestras dos instituciones y cumplía todas las directivas estatales y autonómicas sobre investigación en animales.

Toma de muestras musculares. Los animales fueron sometidos a inducción anestésica (propofol, fentanilo, atracurio y tiopental), siendo mantenidos en fase hipnótica durante el proceso de extracción de las muestras.

Biopsia del diafragma costal (Df). Tras la antisepsia del abdomen superior, se realizó una laparotomía media subxifoidea. El hemidiafragma derecho se traccionó con pinzas, y se obtuvo una muestra de su porción costal por disección cortante. La biopsia fue tomada en la dirección de las fibras musculares. Tras la hemostasia, se procedió al cierre por planos.

Biopsia del intercostal externo (IExt). La muestra se obtuvo de la cara anterolateral del hemitórax derecho, mediante disección cortante y sin uso de electrocoagulación. La hemostasia y cierre fueron similares a los mencionados para el Df.

Biopsia del músculo de la extremidad (VInt). Se obtuvo de la cara interna de la pata trasera derecha del animal. La biopsia se tomó con disección cortante del vientre de la porción del cuádriceps denominada vasto interno (VInt). El cierre fue con la técnica antes citada.

Procesamiento de las muestras musculares

Una vez obtenidas las biopsias, éstas se dividieron en dos porciones (alícuotas). La primera se introdujo directamente en un criovial y se congeló en nitrógeno líquido, siendo conservada a -80°C , hasta su utilización en la determinación de los ácidos nucleicos mensajeros (ARNm) de las citocinas TNF- α e IL-10. Dicha determinación se realizó mediante la técnica de transcripción reversa (obtención de los ADN complementarios [ADNc] de los mencionados ARNm) y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). La segunda porción de la biopsia fue incluida en parafina y se utilizó en el procedimiento inmunohistoquímico de detección del daño de membrana.

Primera porción

La alícuota de la muestra congelada en criovial se pesó, y se procedió seguidamente a la extracción de su ARN total por el método de TRIZOL (Gibco-BRL, Paisley, Renfrewshire, Reino Unido), y cuantificación mediante el sistema Nucleic Acid QuickSticks (Clontech Laboratories, Inc, California, EE.UU.). Seguidamente, se llevó a cabo la transcripción reversa. Este proceso se realizó a partir de $1\ \mu\text{g}$ de ARN total extraído en $10\ \mu\text{l}$ de agua libre de ARNasas, utilizando la enzima transcriptasa reversa y un cebador de oligo dT (Pharmacia, Roosendaal, Países Bajos).

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizaron $2\ \mu\text{l}$ del ADNc obtenido en la retrotranscripción. Las diluciones utilizadas fueron de 1:5 para los ADNc correspondientes a los ARNm de IL-10 y TNF- α , y 1:25 para el de β -actina (utilizada aquí como gen control o *house-keeping gene*). Los cebadores empleados fueron los siguientes:

- Para TNF- α ¹⁰: 3' GCCTCAGCCTCTTCTCTCT
5' CTTGTCACCTGGGGTTTCG
- Para IL-10¹¹: 3' TCACCTGCTCCACCGCCTTGC
5' GGGAGCCAGCCGACACCCAGAG
- Para β -actina: 3' GCTTCGGGCGGAACGTGTA
5' TTGATGTCACGCACGATCT

Este último fue diseñado por los propios autores de este trabajo utilizando el *software* OLIGO: DNA/RNA Primer Analysis (versión 4.1).

La reacción de PCR se desarrolló utilizando $2\ \mu\text{l}$ de las diluciones de ADNc antes especificadas para todos los genes que se iban a analizar. La mezcla incluyó $1\ \text{mM}$ de MgCl_2 ; $10\ \text{mM}$ de Tris-ClH (pH 9,0); $50\ \text{mM}$ de KCl; $2\ \text{mM}$ de dNTPs (Life Technologies[®], Paisley, Francia); una unidad de Taq-polimerasa (Perkin-Elmer, Foster City, EE.UU.), y $12,5\ \text{pm}$ de cebadores ajustados a un volumen total de reacción de $10\ \mu\text{l}$. La PCR se llevó a cabo en un equipo Perkin-Elmer (Cetus DNA Thermal Cycler, Foster City, EE.UU.). El procedimiento se inició antes de añadir la Taq-polimerasa, con un ciclo de $3\ \text{min}$ a 97°C , y $5\ \text{min}$ a 85°C . Durante estos últimos $5\ \text{min}$ se agregó la enzima. Las condiciones variaron a partir de este momento para cada una de las sustancias analizadas. Para los ADNc de TNF- α e IL-10 se emplearon 35 ciclos a temperaturas de unión de 62 y 67°C , respectivamente. Para la β -actina, se utilizaron 28 ciclos a 54°C . Finalizados los ciclos de la PCR, las muestras se dejaron $7\ \text{min}$ más a 72°C para completar la reacción de extensión.

Terminada la PCR se cuantificaron las muestras mediante electroforesis de agarosa al 2% con bromuro de etidio. En cada una de las electroforesis se hizo migrar un patrón de referencia de pesos moleculares (GC-015-001 Hpa II-pBS-DNA, GeneCraft, Münster, Alemania). Finalmente, las imágenes se digitalizaron y cuantificaron (equipo Gel Doc 2000 y programa Molecular Analysis, Bio-Rad). Las determinaciones se realizaron por triplicado, y se utilizó el valor medio obtenido de cada muestra. Todas las correspondientes a un mismo animal se procesaron en el mismo día para las dos citocinas y

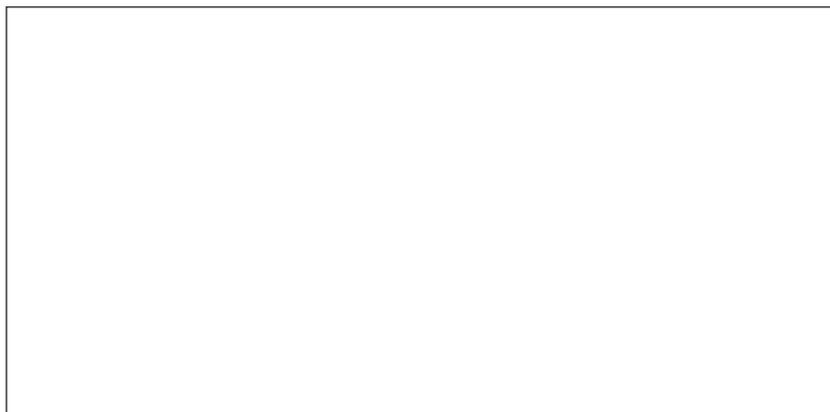


Fig. 1. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Los fragmentos amplificados mediante la técnica de RT-PCR para TNF- α , β -actina e IL-10 tienen los tamaños de 167, 593 y 386 pb, respectivamente.

para el gen control, utilizando un mismo gel de agarosa. Los valores de expresión de los ADNc de IL-10 y TNF- α están expresados como razón entre el valor obtenido en cada caso y el de la amplificación correspondiente del ADNc de la β -actina.

La estandarización de la técnica de RT-PCR para cada uno de los ADNc amplificados se realizó con anterioridad al procedimiento descrito. Para ello se obtuvo sangre periférica heparinizada de un animal de la misma raza canina, que se diluyó 1:2 en un medio apropiado (medio de Dulbecco modificado por Eagle, o DMEM), se centrifugó a 13.000 g durante 20 min (4 °C). Posteriormente, se separó la población mononuclear (gradiente de Ficoll, densidad 1.070 g/l) y se estimularon estas células con con 1 μ g de lipopolisacárido (LPS) (extraído de *E. coli*, serotipo 055:B5, Sigma Cemical, St. Louis, EE.UU.). A continuación se obtuvo el ARN total de los leucocitos y se procedió a la retrotranscripción para obtener el ADNc, con el que se puso a punto la técnica específica de PCR-RT, mediante la que se caracterizó el tamaño de los amplímeros (386 pb para IL-10, 167 pb para TNF- α , y 593 pb para β -actina) y el número de ciclos idóneo en cada caso.

Segunda porción. Los bloques se desparafinaron y cortaron (microtomo Leica RM 2035, Nussloch, Alemania), para obtener secciones transversales de 3 μ m. En cada portaobjetos se colocaron dos cortes de la muestra; uno de ellos se empleó para la tinción inmunohistoquímica y el segundo como control. El grado de daño sarcolémico se evaluó por detección de fibronectina intrafibrilar mediante un anticuerpo específico¹² (IgG PC 057, The Binding Site, Birmingham, Reino Unido), y como segundo anticuerpo se utilizó una anti-IgG de ratón

biotinilado (Universal Secondary-Biotin, The Binding Site, Birmingham, Reino Unido). Las muestras se incubaron con el complejo estreptavidina-peroxidasa (Streptavidin-PEROX, The Binding Site, Birmingham, Reino Unido) para amplificar la reacción, y se sometieron a un sustrato cromógeno (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Múnich, Alemania). Por último, las imágenes fueron captadas y digitalizadas (Microscopio Olympus BX-50F3, Olympus Optical Co. Tokio, Japón, y cámara Pixera Corporation, California, EE.UU.), con el fin de cuantificar el porcentaje de fibras dañadas. Este recuento se realizó sobre un mínimo de 100 fibras por muestra de tejido.

Análisis estadístico. Los datos se expresan como media (\pm desviación estándar [DE]) en las variables con distribución normal, y como mediana y rango intercuartil en la única variable con distribución no normal (daño de membrana en el intercostal externo). La normalidad se analizó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para comparar la expresión de cada citocina entre los diferentes músculos se ha utilizado un análisis de la variancia para medidas repetidas. Para comparar los daños de membrana se ha empleado la prueba de Friedman, y se han utilizado los coeficientes de Spearman o Pearson, según los casos, para evaluar las relaciones entre variables. La significación estadística se ha fijado en un valor de $p \leq 0,05$.

Resultados

La expresión de cada uno de los dos genes analizados en los diferentes músculos se exponen la tabla I y las figuras 1 y 2. Respecto al gen del TNF- α , su expresión

TABLA I
Valores individuales y medios para la expresión de los genes de TNF- α e IL-10, y el daño de membrana en los músculos respiratorios (Df e IExt) y periférico (VInt) estudiados

Animal	ARNm de TNF- α			ARNm de IL-10			Daño sarcolémico		
	Df	IExt	VInt	Df	IExt	VInt	Df	IExt	VInt
1	0	0,17	0	0	5,30	0	1,30	0	0
2	0	0	0,14	1,80	5,70	0,98	0	0	1,00
3	0,02	0	0,30	0,33	0,84	2,29	0	0	4,90
4	0,08	0,08	0,12	0,69	0,56	0,33	7,60	0	0
5	0,05	0	0,09	0,32	4,30	5,05	0	0	3,00
6	0	0	0,20	0,17	2,10	3,30	2,80	0	1,40
7	0,01	0,06	0,13	0,89	2,50	0,54	1,70	0	2,00
8	0,01	0,05	0,13	0,92	2,10	0,56	0	2,10	0
9	0,02	0,10	0,14	0,40	1,05	1,20	0,50	0	1,70
media	0,02	0,05	0,14	0,60	2,70	1,60	1,50	0,20	1,60
\pm DE	0,03	0,06	0,08	0,50	1,90	1,70	2,50	0,70	1,60

Para los datos sobre mediana y rango intercuartil de la única variable sin distribución normal (daño en IExt), véase texto. ARNm: ácido ribonucleico mensajero; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa; IL-10: interleucina 10; Df: diafragma costal; IExt: intercostal externo; VInt: vasto interno.

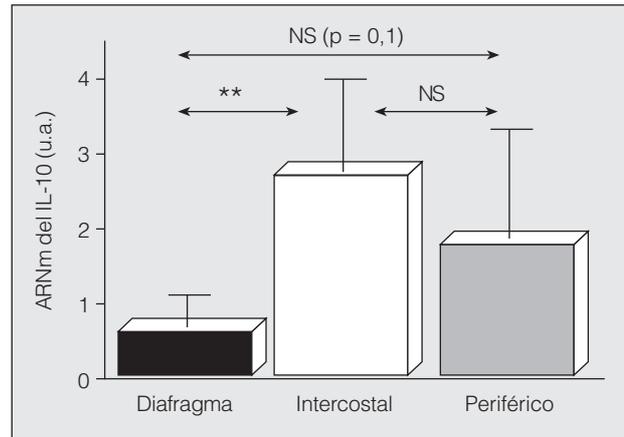
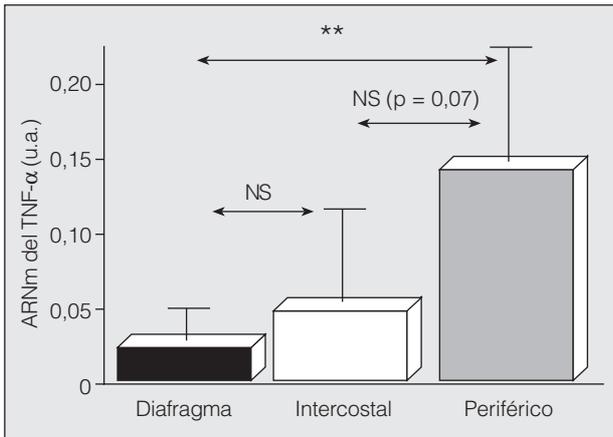


Fig. 2. Expresión de los genes correspondientes a: a) factor de necrosis tumoral (TNF- α), y b) interleucina 10 (IL-10) en los tres músculos estudiados. ** $p < 0,01$; NS: no significativo.

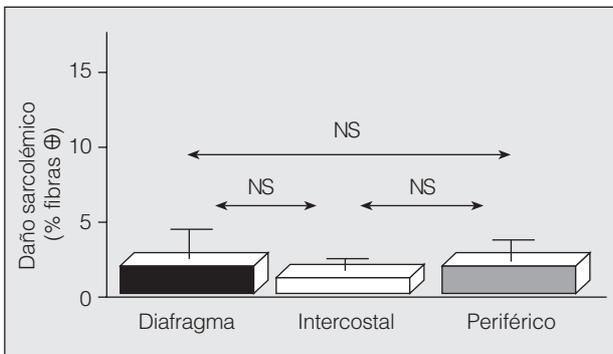


Fig. 3. Nivel de daño de membrana fibrilar en los tres músculos estudiados.

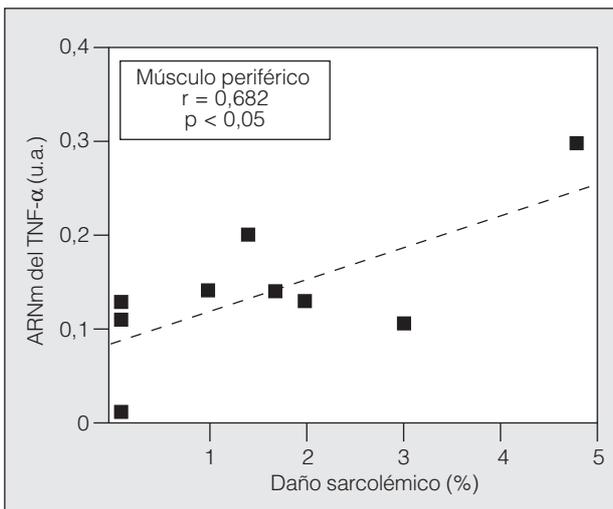


Fig. 4. Relación entre expresión del gen correspondiente al factor de necrosis tumoral (TNF- α) y daño sarcolémico en el músculo periférico.

era mínima en los músculos respiratorios, con tendencia a ser algo mayor en el IExt que en el Df ($0,05 \pm 0,06$ y $0,02 \pm 0,03$ u.a., respectivamente; $p = \text{NS}$). La amplia dispersión de valores en ambos casos limitaba la obtención de diferencias significativas. Por contra, la

expresión era relativamente alta en el músculo periférico (VInt $0,14 \pm 0,08$ u.a.; $p < 0,01$ respecto al Df, y $p = 0,07$ respecto al IExt). Respecto a la IL-10, su expresión era también baja en el Df ($0,6 \pm 0,5$ u.a.), con valores más elevados en IExt ($2,7 \pm 1,9$; $p < 0,01$). Las concentraciones de IL-10 en el músculo periférico se situaron en un valor intermedio ($1,6 \pm 1,7$). Nuevamente se observó una amplia dispersión interindividual de los valores. No se observaron correlaciones estadísticamente significativas entre las expresiones de ambas citocinas para ninguno de los tres músculos analizados. Respecto del daño del sarcolema, éste fue mínimo en todos los casos (fig. 3), con valores algo más bajos en el intercostal (IExt $0,2 \pm 0,7$, mediana 0,0 y rango intercuartílico 0,0; Df $1,5 \pm 2,5$; VInt $1,6 \pm 1,6$). En el VInt, el valor de daño puso de manifiesto una relación directa aunque débil con el grado de expresión del TNF- α ($r = 0,682$; $p < 0,05$) (fig. 4).

Discusión

Los hallazgos más relevantes del presente trabajo son: a) la detección de expresión de TNF- α en homogeneizado del propio músculo esquelético, tanto respiratorio como periférico, en situación basal; b) la observación de valores más bajos de activación del gen de esta citocina en los músculos respiratorios; c) la ausencia en situación basal de relaciones significativas entre los niveles de expresión del TNF- α y la IL-10, y d) la relación entre los valores basales de TNF- α y el daño de membrana fibrilar en el músculo periférico.

Expresión de TNF- α y músculo esquelético

El TNF- α es una citocina inflamatoria de características proteicas¹³, que puede ser sintetizada por diversas células del organismo, entre las que destacan los macrófagos, células T, monocitos, células endoteliales, y miocitos musculares^{8,14}. Hasta la fecha estos últimos parecían capaces de sintetizar TNF- α sólo si eran previamente expuestos en cultivo celular a otras citocinas proinflamatorias⁸. Nuestro trabajo sugiere que existe expresión

constitutiva de TNF- α en el músculo esquelético *in vivo*. Esa expresión parece heterogénea para los diferentes territorios musculares de la economía y es notablemente inferior en el homogeneizado de músculos respiratorios. Recientemente hemos podido confirmar la expresión de TNF- α e IL-10 por la fibra muscular, utilizando la técnica de hibridación *in situ* en muestras procedentes de los animales aquí estudiados¹⁵.

Entre las acciones celulares del TNF- α destacan sus efectos citostático y citotóxico¹⁶, con inducción de apoptosis e inhibición del factor de crecimiento muscular similar a la insulina (IGF)^{13,16}. Éste es necesario para el crecimiento y diferenciación del músculo, por lo que se ha postulado la implicación del TNF- α en diversos procesos que conllevan pérdida de masa muscular^{6,7,17}.

Es interesante recordar además que se ha demostrado la presencia de valores elevados de TNF- α en sangre periférica de pacientes con EPOC^{6,7,18,19}, sobre todo en aquellos con pérdida ponderal. Por otra parte, se ha sugerido que el TNF- α podría estar implicado en la debilidad muscular periférica que se observa con frecuencia en esta entidad, al condicionar una pérdida proteica y disminución en la contractilidad muscular²⁰. Es interesante mencionar que tanto la actividad inflamatoria como la propia nicotina son capaces de estimular la producción de TNF- α ^{8,21}.

Un punto de especial interés del presente trabajo es la observación de una probable expresión local muscular de TNF- α ; expresión que hemos confirmado posteriormente¹⁵. Hasta la fecha, y como ya se ha afirmado, se especulaba con la llegada de esta sustancia a los diferentes territorios por vía sanguínea. Esta concepción, que implica un efecto endocrino, se ha empleado para explicar, entre otras, la miopatía periférica observada en la EPOC. Sin embargo, tiene poco que ver con lo que sabemos de las citocinas, cuya vida media es corta, y que ejercen su efecto predominantemente en el lugar de síntesis o alrededores. La síntesis a escala local muscular parece más coherente con este tipo de acciones y sugiere la posibilidad de que sean las citocinas locales y no las llevadas por el torrente sanguíneo las que desempeñen un papel relevante en la miopatía de la EPOC.

Expresión de IL-10

Ésta es una citocina no inflamatoria, expresada por monocitos, macrófagos, células T y células dendríticas pulmonares^{13,22,23}. Entre sus efectos se hallan la inhibición de la actividad de los macrófagos (en concreto, de su producción de citocinas inflamatorias como el propio TNF- α), de las células T-helper y de las células *natural-killer*²¹⁻²³. La expresión de IL-10 no se había demostrado hasta la fecha en el músculo esquelético. Este trabajo sugiere con fuerza dicha posibilidad, que también hemos demostrado recientemente con técnicas topográficas¹⁵.

La expresión de IL-10 se halla reducida en las secreciones respiratorias de pacientes con EPOC y asma bronquial^{24,25}, y se ha sugerido un papel preventivo de la inflamación bronquial crónica para esta citocina²⁵. En

la fibrosis pulmonar idiopática se ha observado que el gen de la IL-10 se halla sobreexpresado en las células presentes en secreciones respiratorias, regulando además la expresión de TNF- α ²⁶. Por otra parte, algunos fármacos utilizados en patología respiratoria, como los corticoides, parecen capaces de estimular la producción de IL-10²⁷. Hasta el momento, no se había estudiado el papel modulador que esta citocina pudiera desempeñar en el músculo. Nuestros resultados parecen indicar que la IL-10 es expresada constitutivamente por los músculos respiratorios, pero que esa expresión es muy variable y no presenta un patrón diferente de la de otros músculos. Por otra parte, no hemos hallado relación entre las expresiones basales de IL-10 y TNF- α . Esto no resulta del todo sorprendente, ya que en esa situación los valores de ambas citocinas son muy bajos. Futuros estudios deberán elucidar la situación en presencia de estimulación de la expresión del TNF- α .

Relación del TNF- α con el daño de membrana

El hallazgo más relevante a este respecto es la presencia de una relación directa entre la intensidad de expresión del gen de TNF- α y la intensidad de daño de membrana en el músculo periférico. Nuestros datos deben ser tomados con precaución debido a la mínima presencia de daño sarcolémico en nuestros animales, la no observación de asociaciones similares en los otros dos músculos y la disparidad de las técnicas empleadas para la determinación de ambos fenómenos. Sin embargo, constituyen una primera evidencia de lesión estructural muscular ligada con la presencia de esta citocina. Por otra parte, no hemos observado relación entre el valor de daño y la expresión de IL-10, por lo que esta última no parece haber desempeñado un papel protector como era nuestra hipótesis inicial. Sin embargo, es probable que el efecto regulador sea mínimo en situación basal.

El denominado "daño" muscular es considerado hoy día como un fenómeno fisiológico que formaría parte de la constante remodelación que experimenta el músculo esquelético^{9,28}. Así, diferentes estímulos, provocarían fenómenos inicialmente deletéreos en la estructura muscular, como la presencia de "roturas" en la membrana fibrilar, que implicarían el paso de sustancias (iones, proteínas) del medio extracelular a la fibra y viceversa, comportando una inicial disminución de la fuerza de contracción²⁹. Sin embargo, casi al mismo tiempo se produciría la activación del "programa de regeneración muscular", con cambios en la expresión secuencial de los genes que codifican la estructura muscular. El papel desempeñado por la lesión (daño) inicial en la reprogramación del fenotipo del músculo es todavía motivo de debate.

En conclusión: a) tanto el TNF- α como la IL-10 parecen expresarse en el músculo esquelético canino en circunstancias normales; b) los valores de expresión del TNF- α son mucho menores en los músculos respiratorios que en los de las extremidades, y se relacionan con la presencia de daño sarcolémico en estos últimos, y c) la expresión de IL-10 es heterogénea y no presenta un perfil específico de los músculos respiratorios.

Agradecimiento

Queremos expresar nuestro agradecimiento a Francisco José Álvarez por su contribución en la puesta a punto del modelo animal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agustí AGN, Cotes J, Wagner PD. Responses to exercise in lung diseases. En: Wipp Roca J, editors. Clinical exercise testing. Eur Respir Monograph 1997;6:32-50.
2. Killian KJ, LeBlanc P, Martin DH, Summers E, Jones NL, Campbell EJM. Exercise capacity and ventilatory, circulatory, and symptom limitation in patients with chronic airflow limitation. Am Rev Respir Dis 1992;146:935-40.
3. American Thoracic Society & European Respiratory Society. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 1999;159:S1-40.
4. Orozco-Levi M, Gea J, Lloreta J, Félez MA, Minguella JL, Serrano S, et al. Subcellular adaptation of the human diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J 1999;13:371-8.
5. Agustí AG. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. Novartis Found Symp 2001;234:242-54.
6. Nguyen LT, Bedu M, Caillaud D, Beaufre B, Beaujon G, Vasson M, et al. Increased resting energy expenditure is related to plasma TNF-alpha concentration in stable COPD patients. Clin Nutr 1999;18:269-74.
7. 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.
8. De Rossi M, Bernasconi P, Baggi F, De Waal Malefyt R, Mantegazza R. Cytokines and chemokines are both expressed by human myoblasts: possible relevance for the immune pathogenesis of muscle inflammation. Int Immunol 2000;12:1329-35.
9. 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.
10. Pinelli E, Van der Kaaij SY, Broeren CP, Ruitenber EJ, Rutten VP. Measurement of dog cytokines by reverse transcription-quantitative competitive polymerase chain reaction. Immunogenetics 1999;49:696-9.
11. Lu P, Zucker K, Fuller L, Tzakis A, Esquenazi V, Miller J. Cloning and expression of canine interleukin-10. J Interferon Cytokine Res 1995;15:1103-9.
12. Gáldiz JB, Palacio J, Álvarez J, Mariñán M, Orozco-Levi M, Gea J. Evaluación del daño de membrana en las fibras musculares: marcadores biológicos frente a técnicas estándar. Arch Bronconeumol 2001;37(Supl 1):16-7.
13. Thomson AW. The cytokine handbook. Burlington: Academic Press, 1994.
14. Albaugh G, Kann B, Strande L, Vemulapalli P, Hewitt C, Alexander JB. Nicotine induces endothelial TNF-alpha expression, which mediates growth retardation in vitro. J Surg Res 2001;99:381-4.
15. Palacio J, Galdiz JB, Casadevall C, Mariñán M, Orozco-Levi M, Martínez P, et al. Skeletal muscle fibres express TNF- α in mammals [abstract]. Am J Respir Crit Care Med 2002;165(Suppl): A258.
16. Halse R, Pearson SL, McCormack JG, Yeaman SJ, Taylor R. Effects of tumor necrosis factor-alpha on insulin action in cultured human muscle cells. Diabetes 2001;50:1102-9.
17. Staal-van den Brekel AJ, Dentener MA, Schols AM, Buurman WA, Wouters EF. Increased resting energy expenditure and weight loss are related to a systemic inflammatory response in lung cancer patients. J Clin Oncol 1995;13:2600-5.
18. Takabatake N, Nakamura H, Abe S, Hino T, Saito H, Yuki H, et al. Circulating leptin in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 1999;159:1215-9.
19. Schols AM, Buurman WA, Staal van den Brekel AJ, Dentener MA, Wouters EF. Evidence for a relation between metabolic derangements and increased levels of inflammatory mediators in a subgroup of patients with chronic obstructive pulmonary disease. Thorax 1996;51:819-24.
20. Reid MB, Li YP. Cytokines and oxidative signalling in skeletal muscle. Acta Physiol Scand 2001;171:225-32.
21. Lim S, Roche N, Oliver BG, Mattos W, Barnes PJ, Chung JF. Balance of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers: regulation by interleukin-10. Am J Respir Crit Care Med 2000;162:1355-60.
22. Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, Mosmann TR, Moore KW, Rennick DM. Interleukin-10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. J Exp Med 1991;173:507-10.
23. MacNeil IA, Suda T, Mootre KW, Mosmann TR, Zlotnik A. IL-10, a novel growth cofactor for mature and immature T cells. J Immunol 1990;145:4167-73.
24. Takanashi S, Hasegawa Y, Kanehira Y, Yamamoto K, Fujimoto K, Satoh K, et al. Interleukin-10 level in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers. Eur Respir J 1999;14: 309-14.
25. Borish L, Aarons A, Rumblyrt J, Cvietusa P, Negri J, Wenzel S. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. J Allergy Clin Immunol 1996; 97:1288-96.
26. Martínez JA, King TE Jr, Brown K, Jennings CA, Borish L, Mortenson RL, et al. Increased expression of the interleukin-10 gene by alveolar macrophages in interstitial lung disease. Am J Physiol 1997;273:L676-83.
27. John M, Lim S, Seybold J, Jose P, Rochibaud A, O'Connor B, et al. Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce macrophage inflammatory protein-1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon- γ release from alveolar macrophages in asthma. Am J Respir Crit Care Med 1998;157: 256-62.
28. Gea J, Hamid Q, Czaika G, Zhu E, Mohan-Ram V, Goldspink G, et al. Expression of myosin heavy-chain isoforms in the respiratory muscles following inspiratory resistive breathing. Am J Respir Crit Care Med 2000;161:1274-8.
29. Hayot M, Barreiro E, Pérez A, Czaika G, Comtois AS, Grassino AE. Morphological and functional recovery from diaphragm injury: an *in vivo* rat diaphragm injury model. J Appl Physiol 2001; 90:2269-78.