



Original

Citocinas inflamatorias y factores de reparación en los músculos intercostales de pacientes con EPOC grave

Carme Casadevall, Carlos Coronell, Pilar Ausín, Juana Martínez-Llorens, Mauricio Orozco-Levi, Esther Barreiro, Joaquim Gea* y en representación del grupo ENIGMA in COPD

Servei de Pneumologia-URMAR, Hospital del Mar-Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, España. CIBER de Enfermedades Respiratorias (CibeRes), ISCIII, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Bunyola, Balears, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 26 de agosto de 2008

Aceptado el 12 de noviembre de 2008

On-line el 29 de abril de 2009

Palabras clave:

Daño celular

Miocinas

Inflamación

Reparación

Músculos respiratorios

RESUMEN

Introducción: Las acciones locales de las citocinas en los músculos de los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se hallan sometidas a debate. El objetivo del presente estudio ha sido analizar las relaciones entre su expresión y la activación genética de programas de reparación muscular.

Pacientes y métodos: Se incluyó en el estudio a 25 pacientes con EPOC grave en situación estable. Se les realizó una biopsia del músculo intercostal externo, donde se evaluaron los signos de lesión muscular (morfometría), la infiltración de células inflamatorias (inmunohistoquímica) y la expresión de genes seleccionados (técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) correspondientes a las propias citocinas —factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y sus receptores 1 y 2 (TNFR1 y TNFR2), e interleucinas-1 β , 6 y 10—, un marcador panleucocitario (CD18) y moléculas clave en las vías de reparación—miogénesis (Pax7, M-Caderina y Mio-D).

Resultados: La expresión de TNFR2 se relacionó directamente con la función muscular inspiratoria (representada por la presión inspiratoria máxima sostenible; $r = 0,496$, $p < 0,05$), mientras que la expresión de CD18 se relacionó inversamente con ella ($r = -0,462$, $p < 0,05$). Por otra parte, la expresión de los 2 receptores del TNF- α se relacionó directamente con la de las moléculas clave de las vías de reparación analizadas (TNFR1 con Pax7, $r = 0,650$, y M-Caderina, $r = 0,678$, ambas con $p < 0,001$; TNFR2 con Pax7, $r = 0,395$, M-Caderina, $r = 0,409$, y Mio-D, $r = 0,418$, con $p < 0,05$ en todas).

Conclusiones: La expresión de los receptores del TNF- α guarda una estrecha relación tanto con la activación de los programas de miogénesis como con la propia función muscular inspiratoria. Este hecho refuerza nuestra hipótesis de que algunas citocinas locales participan en la reparación de los músculos respiratorios en los pacientes con EPOC.

© 2008 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Inflammatory Cytokines and Repair Factors in the Intercostal Muscles of Patients With Severe COPD

ABSTRACT

Keywords:

Cellular damage

Myokines

Inflammation

Repair

Respiratory muscles

Objective: There is disagreement regarding the local action of cytokines in the respiratory muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The objective of this study was to analyze the relationships between cytokine expression and genetic activation of the mechanisms of muscle repair.

Patients and methods: Twenty-five patients with severe COPD and in stable condition were enrolled in the study. We performed a biopsy of the external intercostal muscle of the patients and analyzed the specimen for signs of muscle lesion (morphometry), infiltration of inflammatory cells (immunohistochemistry), and expression of selected genes (real-time polymerase chain reaction technique) corresponding to the cytokines (tumor necrosis factor α [TNF- α] and its type 1 and 2 receptors [TNFR1 and TNFR2], and interleukin [IL] 1 β , IL-6, and IL-10), a pan-leukocyte marker (CD18), and key molecules in the repair-myogenesis pathways (Pax7, M-cadherin, and MyoD).

Results: Expression of TNFR2 is directly related to inspiratory muscle function (represented by maximum sustainable inspiratory pressure; $r = 0.496$; $P < .05$), whereas expression of CD18 is inversely related ($r = 0.462$; $P < .05$). Moreover, expression of the 2 TNF- α receptors was directly related to that of the key molecules of the repair pathways analyzed (TNFR1 to Pax7 [$r = 0.650$; $P < .001$] and M-cadherin [$r = 0.678$; $P < .001$]; TNFR2 to Pax7 [$r = 0.395$; $P < .05$], M-cadherin [$r = 0.409$; $P < .05$], and MyoD [$r = 0.418$; $P < .05$]).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jgea@imim.es (J. Gea).

Conclusions: Expression of TNF- α receptors bears a close relationship both to activation of the myogenesis programs and to inspiratory muscle function. This reinforces our hypothesis that some local cytokines take part in the repair of respiratory muscles in patients with COPD.

© 2008 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Los músculos respiratorios de los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se ven sometidos a un trabajo incrementado, que deriva de los cambios mecánicos que se producen en su sistema respiratorio. Además, estos cambios tienen como consecuencia una serie de modificaciones estructurales y funcionales en los propios músculos. Por un lado, disminuyen su fuerza y resistencia, lo que se conoce como disfunción muscular, de modo que se vuelven más sensibles al fracaso mecánico. Por otra parte, puede producirse una lesión celular, acompañada de elementos inflamatorios y de reparación. En última instancia, parece claro que se produce una remodelación del músculo, con cambios en su fenotipo fibrilar y en otros de sus componentes¹. Recientemente nuestro grupo ha descrito un aumento de las concentraciones locales de determinadas citocinas proinflamatorias en los músculos intercostal externo y diafragma de los pacientes con EPOC^{2,3}. Sin embargo, el papel de estas sustancias y su interrelación con otros procesos sigue siendo una incógnita^{2,4}. Experimentalmente, se sabe que algunas citocinas, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina (IL) 6, pueden favorecer la proteólisis y la disrupción fibrilar, además de condicionar directamente alteraciones contráctiles^{5,6}. Sin embargo, también se ha observado que la síntesis de estas citocinas y la de sus receptores aumenta tras incrementar el trabajo del músculo y/o inducir lesión muscular⁷⁻⁹, y que su ausencia o bloqueo evita una correcta reparación¹⁰⁻¹². Ésta depende de la formación de nuevo músculo (miogénesis), que en los vertebrados adultos se realiza por medio de la activación de las células satélite, reguladas a su vez por vías señalizadoras en las que aparecen como claves los genes de *Paired box 7* (Pax7), *M-Caderina* y *Mio-D*, junto a los de otros factores de regulación miógena¹³. Nuestra hipótesis es que determinadas citocinas y sus receptores intervienen en la reparación muscular de los pacientes con EPOC, por lo que el incremento local de su producción resultaría en última instancia beneficioso³. En consecuencia, el objetivo del presente trabajo ha sido evaluar la expresión muscular de los genes de citocinas seleccionadas y su relación con la lesión celular y con la expresión de factores miógenos (programas de reparación) en este tipo de pacientes.

Pacientes y métodos

Pacientes

El tamaño de la muestra se calculó sobre la base de estudios anteriores de nuestro grupo^{2,4}. Se incluyó a un total de 25 pacientes con EPOC grave en fase estable, atendidos en las consultas externas de nuestro servicio. El diagnóstico de EPOC grave-muy grave se basó en los criterios de la Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD: volumen espiratorio forzado en el primer segundo/capacidad vital forzada <70%, volumen espiratorio forzado en el primer segundo <50% de los valores de referencia, con una prueba broncodilatadora estándar negativa)¹⁴. La estabilidad se definió como la ausencia de cambios en la semiología y/o la medicación en los 3 meses precedentes al estudio. Para evitar posibles interferencias con otros factores asociados, se excluyó a los pacientes con insuficiencia respiratoria

crónica (presión arterial de oxígeno <60 mmHg en reposo), desnutrición (índice de masa corporal <20 kg/m² y/o índice de masa magra <18 kg/m²), problemas cardiovasculares o neuromusculares, tratamiento con fármacos con efectos potenciales sobre la estructura o función musculares, y pacientes incluidos en programas de rehabilitación o con dificultades para una movilidad normal. El estudio, de tipo transversal, se concibió de acuerdo con los principios de la World Medical Association y fue aprobado por el comité ético de nuestra institución. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado para participar en el estudio.

Evaluación funcional pulmonar y estudio nutricional. Se realizaron una espirometría forzada con prueba broncodilatadora, determinación de volúmenes pulmonares y resistencia de la vía aérea (pletismografía corporal), medición de la transferencia del monóxido de carbono y gasometría arterial, según técnicas estándar y utilizando valores de referencia apropiados para la población local¹⁵⁻¹⁷. La evaluación nutricional incluyó el cálculo del índice de masa corporal (antropometría) y del índice de masa magra (bioimpedancia eléctrica).

Función muscular inspiratoria. Se evaluaron la fuerza y la resistencia de los músculos respiratorios. La primera se evaluó mediante la determinación de la presión inspiratoria máxima, en maniobra estática desde volumen residual, y empleando también valores de referencia para población local¹⁸. La resistencia se valoró determinando la presión inspiratoria máxima sostenible (PIMS) y el tiempo de aguante ante una carga submáxima, para lo cual se utilizó la prueba de cargas umbrales según el método descrito con detalle en trabajos anteriores¹⁹. Brevemente, en la primera parte de la prueba los pacientes respiraron contra resistencias inspiratorias incrementales (8 cmH₂O cada 2 min) de tipo umbral hasta el fracaso. La máxima presión alcanzada se definió como PIMS. En la segunda parte de la prueba, los pacientes respiraron frente a una carga submáxima mantenida equivalente al 80% de la PIMS, también hasta el fracaso. El tiempo en que se mantuvo el esfuerzo ventilatorio se definió como tiempo de aguante ante una carga submáxima.

Biopsias del músculo intercostal

Las muestras de músculo se obtuvieron según la técnica descrita pormenorizadamente con anterioridad¹⁹. De forma breve, tras anestesia local con lidocaína se practicó una incisión horizontal, de unos 2 cm, a la altura del sexto espacio intercostal y de la línea axilar anterior, bajo el límite inferior del músculo pectoral. La muestra se extrajo con tijeras, en dirección paralela a las fibras, tras lo cual se procedió a la sutura por planos. Una porción de la muestra se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -70 °C, mientras que otra porción se incluyó en parafina.

Evaluación de la lesión celular

La muestra parafinada se cortó en secciones de 3 μ m y se tiñó con hematoxilina-eosina. Se procedió entonces a la determinación por microscopía óptica (Olympus BX61, Olympus Life and Material Science Europe GmbH, Hamburgo, Alemania) de la proporción de músculo anormal, siguiendo el método de recuento de puntos con

gradilla²⁰, adaptado a muestras parafinadas. El área de músculo anormal, considerada un buen reflejo del grado de lesión estructural, se definió como el porcentaje de puntos en que se identificaron los criterios estandarizados de alteración estructural respecto del número total de puntos evaluados. Brevemente dichos criterios fueron: núcleos internalizados, núcleos detectables en el espacio intersticial, depósitos de lipofusina, fibras pequeñas con ángulos oblicuos o citoplasma basófilo, fibras que contenían material necrótico, y vasos²⁰. Se utilizaron como referencias de normalidad las recogidas en la literatura médica^{20–22}.

Presencia de células inflamatorias

Se obtuvieron nuevas secciones de 3 µm de la muestra parafinada, que se sometieron a procedimientos inmunohistoquímicos estándar utilizando anticuerpos monoclonales específicos para células inflamatorias; en concreto, el anti-CD45 (marcador genérico leucocitario) y el anti-CD68 (marcador específico de monocitos/macrófagos), clones PG-M1 2B11 y PD7/26 (Dako Cytomation, Carpintería, California, EE.UU.). De forma breve, las secciones se montaron en portaobjetos pretratados con poli-L-lisina, tras lo cual se procedió a su desparafinado y rehidratación. La reactividad ante los anticuerpos primarios se detectó mediante el método tradicional de avidina-biotina-inmunoperoxidasa (equipo LSAB+HRP, Dako Cytomation Inc., Carpintería, California, EE.UU.). El anticuerpo primario se omitió en los controles negativos. La positividad para CD45 y/o CD68, valorada por microscopía óptica con digitalización de la imagen, se expresa en forma de células positivas por milímetro cuadrado. Se utilizaron como referencias de normalidad las recogidas en la bibliografía^{20,22–24}.

Expresión de los genes seleccionados

Se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, por sus características de precisión cuantitativa. Se evaluaron los siguientes 12 genes mediante la determinación de sus transcriptomas (ARN mensajero) en el músculo:

- Citocinas: TNF- α y sus 2 receptores (TNFR1 y TNFR2), IL-1 β , IL-6 e IL-10.

- Marcador de células leucocitarias: integrina panleucocitaria CD18.
- Marcadores de lesión o estrés celular: isoformas no adultas de las cadenas pesadas de miosina, tanto embrionaria (MyHC-emb) como perinatal (MyHC-peri).
- Genes ligados a la miogénesis: Pax7, M-Caderina y Mio-D.

Los detalles sobre la realización de la técnica se han descrito con detalle en otra publicación². De forma muy breve, se extrajo el ARN (método del TRIzol, Life Technologies, Frederick, Maryland, EE.UU.), para a continuación sintetizar el ADN complementario (GeneAmp PCR system 2400, Perkin Elmer, Richmond, California, EE.UU.). Tras la transcripción inversa se efectuaron las reacciones de PCR —sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7900HT y análisis Taqman (Assays-on-Demand Gene Expression Products, Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.— (tabla 1). Las muestras se procesaron siempre por triplicado. Como gen control endógeno (*housekeeping*) se utilizó el de la β_2 -microglobulina, por su gran estabilidad en el músculo²⁵. Los datos se analizaron con el programa Sequence Detector, versión 2.1 (SDS 2.1), utilizando el método comparativo estándar para cuantificación relativa (C_T)^{2,26}.

Análisis estadístico

Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. El grado de relación entre las variables cuantitativas se ha evaluado mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Se estableció la significación estadística en un valor de $p = 0,05$.

Resultados

Características clínicas y funcionales

Las características de los pacientes, su estado nutricional, los datos de función pulmonar y función muscular inspiratoria se exponen en la tabla 2. De forma breve, los pacientes mostraron una antropometría y composición corporal dentro de la normalidad, con una función pulmonar en la que destacaba la importante obstrucción al flujo aéreo, con hiperinsuflación pulmonar, reducción de la transferencia del monóxido de carbono e hipoxemia ligera en reposo, sin hipercapnia. La función muscular

Tabla 1

Secuencia de las sondas utilizadas en cada caso para la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Gen	Identificación del ensayo	Secuencia de la sonda (5'-3')	Acceso Genbank
Citocinas y receptores			
IL-1 β	Hs00174097_m1	TATGGAGCAACAAGTGGTGTCTCC	NM_000576
IL-6	Hs00174131_m1	ATTCAATGAGGAGACTTGCTGGTG	NM_000600
IL-10	Hs00174086_m1	GCCTTAATAAGCTCCAAGAGAAAG	NM_000572
TNF- α	Hs00174128_m1	ATGTTGTAGCAAACCTCAAGCTGA	NM_000594
TNFR1	Hs00533560_m1	CCTGCTGCTGCCACTGGTCTCTCG	NM_001065
TNFR2	Hs00153550_m1	GAAGCCAAGTGCTCCTACTGCTCG	NM_001066
Miogénesis-reparación			
Pax7	Hs00242962_m1	CTGGGCGACAAAGGGAACCGGCTGG	NM_002584
M-Caderina	Hs00170504_m1	GACTGATCGCTTCAGGCTAAGAGCG	NM_004933
Mio-D	Hs00159528_m1	GGCGCCAGCGAACCCAGGCCGGG	NM_002478
Lesión-estrés celular			
MyHC-emb	Hs00159463_m1	ACAACAGACCTGGTGGTCAAACC	NM_002470
MyHC-peri	Hs00267293_m1	GATGTTGCAAAGGAGAGAAGCACTT	NM_002472
Marcador panleucocitario			
CD18	Hs01051742_m1	GTGGATGAGAGCCGAGAGTGTGG	NM-000211
Control endógeno (<i>housekeeping</i>)			
β_2 -microglobulina	Hs99999907_m1	AGTGGGATCGAGACATGTAAGCAGC	NM_004048

CD18: integrina panleucocitaria; IL: interleucina; MyHC-emb: isoforma embrionaria de las cadenas pesadas de miosina; MyHC-peri: isoforma perinatal de las cadenas pesadas de miosina; Pax7: *Paired box gene*; TNF- α : factor de necrosis tumoral α ; TNFR1 y TNFR2: receptores 1 y 2, respectivamente, del TNF- α .

inspiratoria se hallaba afectada, con disminución tanto de la fuerza como de la resistencia.

Daño muscular y presencia de células inflamatorias

Los signos de lesión fueron discretos (media \pm desviación estándar: $1,38 \pm 1,09\%$ de músculo anormal), fundamentalmente a expensas de la presencia de núcleos internalizados. Respecto a las células inflamatorias, su número era también relativamente bajo ($2,38 \pm 2,32 \text{ mm}^2$), con una ligera tendencia a guardar una relación inversa con la función muscular inspiratoria. Dicha relación inversa sí resultó significativa para la expresión del marcador genético panleucocitario CD18, tanto con la fuerza como con la resistencia de los músculos inspiratorios (fig. 1a).

Expresión de genes relacionados con las citocinas y la miogénesis

La expresión de las diversas citocinas inflamatorias no mostró relaciones significativas con las variables funcionales. Por el contrario, la del receptor TNFR2 sí se relacionaba directamente con la resistencia de los músculos inspiratorios (fig. 1b). Por su parte, la expresión de los 2 receptores de TNF- α se relacionó directamente tanto entre sí (tabla 3) como con la de las diversas

moléculas seleccionadas de los programas de reparación/miogénesis (fig. 2 y tabla 3).

Respecto de las relaciones entre la expresión de citocinas y la presencia de lesión, la de TNF- α se relacionó directamente tanto con el daño general (fig. 3a y tabla 3) como con la presencia específica de núcleos intracelulares ($r = 0,575$, $p < 0,01$). También se observó una relación directa (tabla 3) de la expresión de los marcadores genéticos de daño tanto entre sí (MyHC-emb y MyHC-peri) como con los marcadores de regeneración (p. ej., M-Caderina con MyHC-emb y con MyHC-peri). Además, estos últimos mostraban una relación interna directa (p. ej., M-Caderina con Pax7 y con Mio-D) (fig. 3b y tabla 3).

Discusión

El hallazgo fundamental de este trabajo son las estrechas relaciones observadas en la expresión de 2 grupos de genes aparentemente dispares en su función —los relacionados con la actividad de las citocinas y aquéllos ligados a los programas de miogénesis/reparación—, en los músculos respiratorios de pacientes con EPOC. Además se confirman la lesión de la estructura muscular y la relativa ausencia de células inflamatorias.

La observación de un pequeño porcentaje de músculo con signos de lesión^{20–22} corrobora hallazgos anteriores de nuestro grupo. En estos trabajos previos, en los que se utilizaron otras técnicas histológicas, también se observaron alteraciones estructurales en diferentes músculos respiratorios de los pacientes con EPOC^{2,27}. Los resultados del presente estudio coinciden igualmente con nuestras observaciones previas en modelos animales, según las cuales el aumento de cargas ventilatorias puede inducir lesión muscular^{28,29}.

Este trabajo también amplía hallazgos anteriores de nuestro grupo sobre la presencia de citocinas en los músculos. Por un lado, la expresión de estas sustancias y de sus receptores, en ausencia de un número significativo de células inflamatorias^{20,22–24}, hace probable un origen mayoritariamente muscular. Hoy día está claro que las fibras son capaces de sintetizar diversas citocinas, que actuarían de forma autocrina/paracrina^{30–32}. Sin embargo, no puede descartarse totalmente una síntesis por parte de otras estirpes celulares, como las células sanguíneas. El papel de las citocinas en los músculos no está todavía claro. Se sabe que promueven la pérdida de proteínas y que ejercen una acción nociva directa sobre la contracción^{5,6}. Por otra parte, su aparición tras ejercicios intensos y/o lesión muscular^{7–9} invita a pensar que desempeñan un papel relevante en la reparación. En el mismo sentido, estudios recientes han demostrado que la ausencia de receptores de TNF- α condiciona una reparación muscular

Tabla 2
Características de los pacientes

Datos generales y evaluación nutricional	
Edad (años)	67 \pm 6
IMC (kg/m ²)	26,4 \pm 3,9
IMM (kg/m ²)	19,8 \pm 1,3
Función pulmonar	
FEV ₁ (% ref.)	31 \pm 10
FEV ₁ /FVC (%)	43 \pm 9
RV/TLC (%)	65 \pm 10
DLco (% ref.)	57 \pm 16
PaO ₂ (mmHg)	72 \pm 9
PaCO ₂ (mmHg)	42,2 \pm 3,1
Función muscular inspiratoria	
PIM (% ref.)	61 \pm 21
PIMS (cmH ₂ O)	-45 \pm 13 (VNL > -55)
Tlim (min)	12,4 \pm 6,6 (VNL > 15)

Los datos se presentan como media \pm desviación estándar. DLCO: transferencia del monóxido de carbono; FEV₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; FVC: capacidad vital forzada; IMC: índice de masa corporal; IMM: índice de masa magra; PaCO₂: presión parcial de anhídrido carbónico en sangre arterial; PaO₂: presión parcial de oxígeno en sangre arterial; PIM: presión inspiratoria máxima; PIMS: presión inspiratoria máxima sostenible; RV: volumen residual; TLC: capacidad pulmonar total; Tlim: tiempo de aguante inspiratorio; VNL: valores normales en nuestro laboratorio.

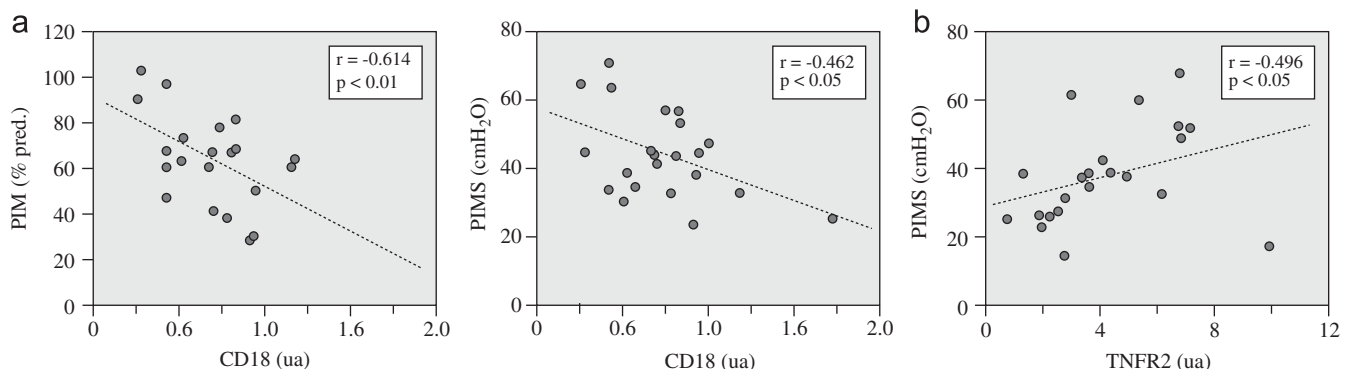


Figura 1. a) Relaciones entre la fuerza —representada por la presión inspiratoria máxima (PIM)— y la resistencia —expresada por la PIM sostenible (PIMS)— de los músculos inspiratorios y la expresión del marcador leucocitario (CD18), y b) relación entre la resistencia muscular y la expresión del receptor 2 del factor de necrosis tumoral alfa (TNFR2). ua: unidades arbitrarias.

Tabla 3
Correlaciones entre las diversas variables biológicas

	TNFR1 (ua)	TNFR2 (ua)	IL-1β (ua)	IL-6 (ua)	Músculo anormal (%)	MyHC-emb (ua)	MyHC-peri (ua)	Pax7 (ua)	M-Caderina (ua)	Mio-D (ua)
TNF-α (ua)	r = -0,049 p = 0,815	r = 0,356 p = 0,08	r = -0,12 p = 0,563	r = -0,13 p = 0,536	r = 0,518 p = 0,01	r = 0,189 p = 0,365	r = 0,192 p = 0,359	r = 0,160 p = 0,445	r = 0,121 p = 0,565	r = 0,104 p = 0,621
TNFR1 (ua)		r = 0,456 p < 0,05	r = 0,147 p = 0,484	r = 0,054 p = 0,796	r = 0,139 p = 0,517	r = 0,004 p = 0,986	r = 0,033 p = 0,876	r = 0,650 p < 0,001	r = 0,678 p < 0,001	r = 0,208 p = 0,318
TNFR2 (ua)			r = 0,295 p = 0,152	r = 0,364 p = 0,07	r = 0,111 p = 0,604	r = 0,278 p = 0,178	r = 0,272 p = 0,188	r = 0,395 p = 0,05	r = 0,409 p < 0,05	r = 0,418 p < 0,05
IL-1β (ua)				r = 0,559 p < 0,01	r = -0,04 p = 0,838	r = -0,38 p = 0,06	r = -0,18 p = 0,385	r = -0,15 p = 0,479	r = -0,33 p = 0,107	r = -0,09 p = 0,677
IL-6 (ua)					r = 0,140 p = 0,514	r = -0,04 p = 0,857	r = -0,09 p = 0,647	r = -0,03 p = 0,880	r = -0,19 p = 0,364	r = -0,09 p = 0,660
Músculo anormal (%)						r = 0,079 p = 0,715	r = 0,016 p = 0,942	r = 0,015 p = 0,944	r = 0,177 p = 0,407	r = 0,299 p = 0,155
MyHC-emb (ua)							r = 0,773 p < 0,001	r = 0,196 p = 0,349	r = 0,402 p < 0,05	r = 0,138 p = 0,511
MyHC-peri (ua)								r = -0,04 p = 0,861	r = 0,373 p = 0,06	r = 0,319 p = 0,121
Pax7 (ua)									r = 0,661 p < 0,001	r = 0,200 p = 0,338
M-Caderina (ua)										r = 0,553 p < 0,01

ua: unidades arbitrarias; resto de abreviaturas en tabla 1.

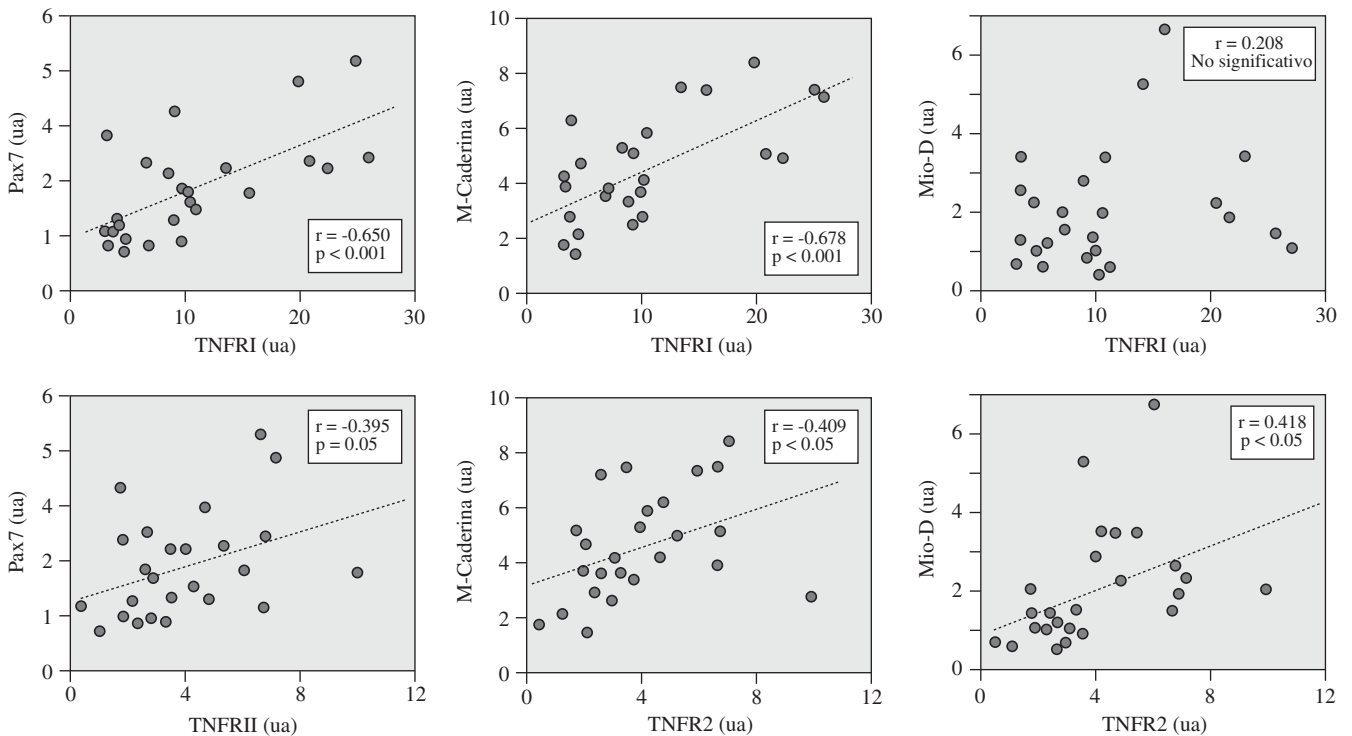


Figura 2. Relaciones directas observadas entre la expresión de los 2 receptores del factor de necrosis tumoral alfa (TNFR1 y TNFR2) y las diversas moléculas ligadas a los programas de reparación/miogénesis (Pax7, M-Caderina y Mio-D). NS: no significativo; ua: unidades arbitrarias.

defectuosa^{10,11}, ya que su activación resulta imprescindible para la diferenciación miógena. Nuestros resultados, que muestran una relación estrecha entre la expresión de los receptores del TNF-α y la de factores miógenos en los músculos intercostales de los pacientes con EPOC, parecen apuntar en esta última dirección. Similar interpretación puede darse a la relación directa observada entre la expresión de dichos receptores y la función muscular^{2,4}. Todo ello apunta a que las citocinas locales desempeñan un papel relevante en la reparación y preservación funcional del músculo.

El mecanismo de estimulación de la síntesis de citocinas en los músculos respiratorios no está todavía claro, pero probablemente dependa de la actividad previa, presencia de lesión celular y/o apoptosis^{7,9,33,34}. En este sentido, se ha observado la sobreexpresión de estas sustancias en el diafragma de ratas sometidas a cargas respiratorias aumentadas⁹ o a enfisema experimental³⁴.

En cuanto a las limitaciones del estudio, éste se ha centrado en explorar las relaciones de los diversos fenómenos biológicos en pacientes con EPOC. No se ha realizado una comparación con un

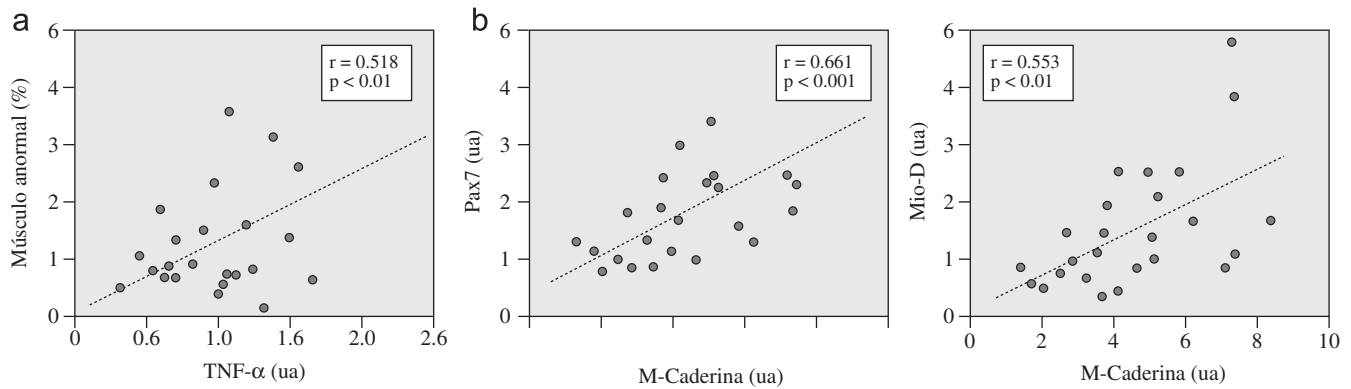


Figura 3. a) Relaciones entre la expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la proporción de músculo anormal (índice de lesión muscular), y b) relaciones internas entre diversos marcadores de activación miógena: M-Caderina con Pax7 y con Mio-D. ua: unidades arbitrarias.

grupo control fundamentalmente por 2 razones. En primer lugar, porque el objetivo específico del estudio era explorar las relaciones entre el daño muscular, la expresión de citocinas y la activación de programas de reparación en el músculo de los propios pacientes. Esto, unido a la relativa agresividad del procedimiento, no justificaría la inclusión de personas sanas. En segundo lugar, porque nuestro grupo ya ha publicado estudios en que se realiza la comparación con un grupo control^{2,3} y se dispone de valores que pueden utilizarse como referencia²⁰⁻²⁴. Por último, en las personas sanas y en circunstancias normales, los programas de reparación muscular permanecen relativamente inactivados.

Por otra parte, se decidió analizar el intercostal externo, que no se considera el principal músculo inspiratorio, debido a nuestro deseo de excluir cualquier comorbilidad. Es conocido que las muestras de diafragma se obtienen habitualmente de personas a quienes se realizan intervenciones quirúrgicas por enfermedad grave asociada.

Por último, es cierto que la técnica utilizada para valorar la expresión de los genes (PCR en tiempo real) no permite asegurar su origen celular. Sin embargo, dicha técnica es la más adecuada para el objetivo principal del presente trabajo, que era evaluar cuantitativamente su expresión.

En resumen, este trabajo confirma la presencia de lesión celular, aunque de escasa cuantía, en el músculo intercostal externo de pacientes con EPOC, al tiempo que demuestra concentraciones bajas de células inflamatorias y una estrecha relación entre la expresión de los receptores de TNF- α y la activación de programas de miogénesis. Esto último induce a pensar que dicha citocina desempeña un papel relevante en la reparación y remodelación de los músculos respiratorios de los pacientes con EPOC.

Financiación

Estudio financiado parcialmente por QLRT-2000-00417 y QLRT-2001-02285 (Comisión Europea), SAF 2001-0426 (Plan Nacional I+D), RTIC C03/11 (Red RESPIRA-ISCI) y CB06/06/0043 (CibeRes, ISCIII).

Bibliografía

- Gea J, Barreiro E, Orozco-Levi M. Free radicals, cytokines and respiratory muscles in COPD patients. *Clin Pulm Med.* 2007;14:117-26.
- Casadevall C, Coronell C, Ramírez-Sarmiento A, Martínez-Llorens J, Barreiro E, Orozco-Levi M, et al. Upregulation of proinflammatory cytokines in the intercostal muscles of COPD patients. *Eur Respir J.* 2007;30:1-7.
- Casadevall C, Barreiro E, Orozco-Levi M, Minguella J, Gea J. Local expression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha: is it the baddy or the goody in the story of respiratory muscle adaptation occurring in COPD? [resumen]. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3:A26.
- Barreiro E, Schols AMW, Polkey MI, Gáldiz JB, Gosker HR, Swallow EB, et al. Cytokine profile in the quadriceps muscles of patients with severe COPD. *Thorax.* 2008;63:100-7.
- Debigare R, Cote CH, Maltais F. Peripheral muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease. Clinical relevance and mechanisms. *Am J Crit Care Med.* 2001;164:1712-7.
- Reid MB, Lännergren J, Westerblad H. Respiratory and limb muscle weakness induced by tumor necrosis factor- α . Involvement of muscle myofibrils. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:479-84.
- Pedersen BK, Ostrowski K, Rohde T, Bruunsgaard H. The cytokine response to strenuous exercise. *Can J Physiol Pharmacol.* 1998;76:505-11.
- Tomiya A, Aizawa T, Nagatomi R, Sensui H, Kokubun S. Myofibers express IL-6 after eccentric exercise. *Am J Sports Med.* 2004;32:503-8.
- Vassilakopoulos T, Divangahi M, Rallis G, Kishta O, Petrof B, Comtois A, et al. Differential cytokine gene expression in the diaphragm in response to strenuous resistive breathing. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170:154-61.
- Chen SE, Gerken E, Zhang Y, Zhan M, Mohan RK, Li AS, et al. Role of TNF- α signalling in regeneration of cardiotoxin-injured muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;289:C1179-87.
- Chen SE, Jin B, Li YP. TNF- α regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292:C1660-71.
- Warren GL, Hulderman T, Jensen N, McKinsty M, Mishra M, Luster MI, et al. Physiological role of tumor necrosis factor alpha in traumatic muscle injury. *FASEB J.* 2002;16:1630-2.
- Bryson-Richardson RJ, Currie PD. The genetics of vertebrate myogenesis. *Nat Rev Genet.* 2008;9:632-46.
- Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, December 2007. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD. Disponible en: www.goldcopd.com.
- Roca J, Sanchis J, Agustí-Vidal A, Segarra F, Navajas D, Rodríguez-Roisin R, et al. Spirometric reference values from a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir.* 1986;22:217-24.
- Roca J, Burgos F, Barberà JA, Sunyer J, Rodríguez-Roisin R, Castellsague J, et al. Prediction equations for plethysmographic lung volumes. *Respir Med.* 1998;92:454-60.
- Roca J, Rodríguez-Roisin R, Cobo E, Burgos F, Pérez J, Clausen JL. Single-breath carbon monoxide diffusing capacity prediction equations from a Mediterranean population. *Am Rev Respir Dis.* 1990;141:1026-32.
- Morales P, Sanchis J, Lamb PJ, Díez JL. Maximum static respiratory pressures in adults. The reference values for a Mediterranean Caucasian population. *Arch Bronconeumol.* 2007;33:213-9.
- Ramírez-Sarmiento A, Orozco-Levi M, Güell R, Barreiro E, Hernández 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.
- Macgowan NA, Kenneth GE, Road JD, Reid WD. Diaphragm injury in individuals with airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:1654-9.
- Scott A, Wang X, Road JD, Reid WD. Increased injury and intramuscular collagen of the diaphragm in COPD: autopsy observations. *Eur Respir J.* 2006;27:51-9.
- Wang X, Jiang TX, Road JD, Redenbach DM, Reid WD. Granulocytosis and increased adhesion molecules after resistive loading of the diaphragm. *Eur Respir J.* 2005;26:786-94.
- 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.

24. Montes de Oca M, Torres SH, De Sanctis J, Mata A, Hernández N, Tálamo C. Skeletal muscle inflammation and nitric oxide in patients with COPD. *Eur Respir J*. 2005;26:390–7.
25. Mahoney DJ, Carey K, Fu MH, Snow R, Cameron-Smith D, Parise G, et al. Real-time RT-PCR analysis of housekeeping genes in human skeletal muscle following acute exercise. *Physiol Genomics*. 2004;18:226–31.
26. Livak K, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*. 2001;25:402–8.
27. 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.
28. 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.
29. Palacio J, Gáldiz JB, Mariñán M, Orozco-Levi M, Martínez P, Bech JJ, et al. Cellular damage and expression of IL-10 and TNF- in skeletal muscles following resistive inspiratory breathing [resumen]. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(Suppl):A147.
30. Saghizadeh M, Ong JM, Garvey T, Henry RR, Kern PA. The expression of TNF α by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J Clin Invest*. 1996;97:1111–6.
31. Li YP, Reid MB. Effect of tumor necrosis factor-alpha on skeletal muscle metabolism. *Curr Opin Rheumatol*. 2001;13:483–7.
32. Keller P, Keller C, Carey AL, Jauffred S, Fischer CP, Steensberg A, et al. Interleukin-6 production by contracting human skeletal muscle: autocrine regulation by IL-6. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;310:550–4.
33. Koçtürk S, Kayatekin BM, Resmi H, Açıkğöz O, Kaynak C, Ozer E. The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and soleus muscle fibers in rats. *Eur J Appl Physiol*. 2008;102:515–24.
34. Degens H, Swisher AK, Heijdra YF, Siu PM, Dekhuijzen PN, Alway SE. Apoptosis and Id2 expression in diaphragm and soleus muscle from the emphysematous hamster. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293:R135–44.