



Efecto del CO₂ sobre el diafragma de rata *in vitro*

M.J. Barranco, J. Cortijo*, M.A. Ciscar, M. Ramón y G. Juan

Servicio de Neumología. Hospital General Universitario. *Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Valencia.

La acidosis producida por aumento de CO₂ disminuye la contractilidad y aumenta la fatigabilidad del músculo estriado. Se discute a qué niveles de CO₂ y en qué modelos de experimentación tiene lugar este hecho. Por ello, se estudia en este trabajo el efecto de concentraciones crecientes de CO₂ sobre la contractilidad y fatigabilidad en tiras de diafragma de rata *in vitro*.

Se estudiaron 6 tiras de diafragma de rata de bajo peso mantenidas en baño de órganos a las que se aplicaron estímulos supramáximos de 1, 10, 50 y 100 Hz, variando la concentración de CO₂ de 5% (29 mmHg), 10% (48,3 mmHg) y 20% (102 mmHg). La fatigabilidad se estudió aplicando estímulos de 50 Hz, 45 series por minuto durante 15 minutos.

Se obtuvieron los siguientes resultados: *a)* contractilidad. La fuerza de contracción fue menor con 20% CO₂ que con 5% cuando se estimuló con 1 Hz. Para el resto de concentraciones y frecuencias no se encontraron diferencias significativas. *b)* Fatigabilidad. La fuerza de contracción fue menor a medida que se aumentaba la concentración de CO₂, siendo significativas las diferencias con las 3 concentraciones.

Las conclusiones fueron: *a)* incrementos de CO₂ de 5 a 20% producen una significativa disminución en la fuerza de contracción cuando se estimula a baja frecuencia, y *b)* aumentos de CO₂ del 5 al 10 y 20% hacen que el músculo sea más fácilmente fatigable.

Palabras clave: *Contractilidad muscular. Fatigabilidad muscular. Hipercapnia.*

Arch Bronconeumol 1994; 30: 445-448

Introducción

Es conocido que la acidosis disminuye la contracción del músculo cardíaco¹ y del músculo esquelético², mientras que la alcalosis tiene un efecto contrario³. Fitzgerald ha demostrado que la acidosis debida a hipercapnia aguda o a una disminución del bicarbonato sanguíneo disminuye la fuerza de contracción del

Impact of CO₂ on the rat diaphragm *in vitro*

Acidosis produced by an increase in CO₂ concentration decreases contractility and increases the tendency to fatigue in striated muscle. It is not clear a what levels of CO₂ this effect takes place, or in what experimental models it can be observed. In this study we examine the effect of increasing concentrations of CO₂ on contractility and fatigue in strips of rat diaphragm *in vitro*.

Six strips of diaphragm from a rat of low-weight were kept in organ bath and supramaximal stimuli of 1, 10, 50 and 100 Hz were applied while CO₂ concentration was changed from 5% (29 mmHg), to 10% (48.3 mmHg) to 20% (102 mmHg). To study fatigue we applied 45 series of 50 Hz stimuli per minute for 15 minutes.

We obtained these results: *a)* Contractility. Force of contraction was less with 20% CO₂ than with 5% under a stimulus of 1 Hz. No significant differences were found for other concentrations or frequencies. *b)* Fatigue. Force of contraction decreases as CO₂ concentration increased and significant differences were found for all 3 concentrations.

The conclusions were: *a)* an increase in CO₂ from 5% to 20% produces a significant decrease in force of contraction under conditions of low-frequency stimuli and *b)* increases in CO₂ concentration from 5% to 10 to 20% increase the muscle's susceptibility to fatigue.

Key words: *Muscle. Contractility. Fatigue. Hypercapnia.*

diafragma de rata *in vitro*⁴. También hay evidencias que indican que la acidosis tiene un efecto negativo en el proceso de fatiga muscular⁵ y que la alcalosis acelera el proceso de recuperación de la fatiga⁶. Clínicamente, se ha visto que los pacientes con limitación crónica al flujo aéreo e hipercapnia tienen unas presiones inspiratorias y espiratorias estáticas máximas menores que los pacientes con similar grado de afectación mecánica pulmonar pero en normocapnia⁷, sugiriendo que la hipercapnia tendría un efecto negativo en la contractilidad de los músculos respiratorios. Usando modelos *in vivo* también está demostrado que la acidosis afecta la contractilidad y fatigabilidad del diafragma en perros⁴ y humanos⁵.

Correspondencia: Dr. M.J. Barranco. Servicio de Neumología. Hospital General de Valencia. Avda. Tres Cruces, s/n. 46014 Valencia.

Recibido: 22-11-93; aceptado para su publicación: 19-4-94.



El propósito de este trabajo es averiguar si concentraciones crecientes de CO₂ en un baño de órganos afectan la contractilidad de tiras de diafragma de rata estimuladas eléctricamente con diferentes frecuencias (curva fuerza-frecuencia). También se estudia en la tira de diafragma la fatigabilidad midiendo el descenso en la fuerza producida por estímulos eléctricos repetitivos, con diferentes concentraciones de CO₂.

Material y métodos

Montaje de la preparación

Dado que con espesores mayores de 1 mm puede ser inadecuada la oxigenación de la parte central del músculo, se han usado ratas Spragle-Dawley de poco peso (80-120 g) con un grosor de diafragma de 0,3-0,5 mm. La rata se sacrifica de un golpe en la cabeza, posteriormente se abre el tórax y se separa el diafragma entero cortando la caja torácica circunferencialmente por arriba y debajo del diafragma. Todo el bloque se introduce en una solución de Krebs oxigenada (CINa 137 mM, ClK 4 mM, CIMg 1 mM, CO₃HNa 12 mM, Cl₂Ca 2 mM, glucosa 6,5 mM) burbujeada con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) y mantenida a temperatura ambiente (20-21 °C) y pH 7,4-7,6. Una vez dentro de baño se extraen las tiras de 2-3 mm de ancho a lo largo de las líneas musculares, dejando el diafragma unido a las costillas en un extremo y al tendón central en el otro. Esto se lleva al baño de órganos con Krebs y carbógeno, fijando el extremo de la costilla y el tendón a un transductor isométrico tipo Letica UF-1, provisto de un tornillo micrométrico de precisión. El transductor se conectó a un registrador bicanal Phillips PM-8222, con un amplificador Hewlett-Packard 8805B.

El músculo se estimuló con 2 electrodos de acero inoxidable en forma de anillo, montados sobre una superficie aislante y dirigidos perpendicularmente a los extremos de la tira del diafragma, procurando en todo momento que no existiera contacto entre los electrodos y el músculo. Mediante un estimulador Medelec se aplicaron estímulos rectangulares de 0,2 ms de duración con una frecuencia de 1, 10, 50 y 100 Hz para el estudio de la curva fuerza-frecuencia y con una frecuencia de 50 Hz para el proceso de fatiga.

Protocolo experimental

Efecto del CO₂ sobre la contractilidad del diafragma. Una vez dispuesta la preparación se mantiene 30 min con CO₂ 5% para termorregulación. Seguidamente se averiguó la longitud a la cual se alcanzaba la máxima tensión con un estímulo. Usando esa longitud se aplicaron estímulos supramáximos de 0,2 ms de 1, 10, 50 y 100 Hz con CO₂ 5% y se midió la fuerza de contracción. Posteriormente se repitió la experiencia con 10 y 20% de CO₂, siendo el resto O₂. Esto supuso un pH del medio de 7,45, 7,27, y 7,0 y una PCO₂ de 29, 48 y 102 mmHg para las diferentes concentraciones de CO₂. En cada concentración de CO₂ se estuvo al menos 15 minutos antes de empezar los estímulos para equilibración. Siempre se siguió el orden de 5, 10 y 20% de CO₂, comprobando con una preparación paralela que el tiempo que duraba la experiencia no influía en la contractilidad de la tira de diafragma; es decir, no había fatiga de la preparación (igual contractilidad al inicio y al final si no varía el CO₂).

Cada estímulo se repitió 3 veces y se obtuvo la media. La fuerza se expresó en porcentaje de la fuerza de contracción máxima: 100 Hz con CO₂ 5%.

Se estudiaron 6 tiras de diafragma, procedentes de ratas distintas, con las 3 concentraciones de CO₂.

Fatigabilidad. Las tiras de diafragma se fatigaron estimulándolas repetidamente con series de estímulos supramáximos de 50 Hz (45 series por min). El estímulo se mantuvo durante 15 min. Las fibras se fatigaron con 5, 10 y 20% de CO₂. Se usaron 6 tiras de diafragma procedentes de diferentes ratas con cada concentración de CO₂. La fuerza de contracción se expresó en porcentaje de la del inicio del proceso de fatiga.

Tratamiento estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el test ANOVA-one way, y el alfa se estableció en 0,05.

Resultados

Contractilidad

En cada preparación se obtuvo la fuerza de contracción máxima con 5% de CO₂ y 100 Hz, y a ella se refirieron en porcentaje las fuerzas obtenidas con las diferentes concentraciones de CO₂ y frecuencias de estimulación. La media y desviación estándar de esta fuerza de contracción máxima para las diferentes preparaciones fue en valores absolutos de 10,8 ± 2,1 g. Los valores obtenidos (en porcentaje de la fuerza máxima de cada preparación) sólo fueron significativamente diferentes con 1 Hz y entre 5 y 20% de CO₂ (p < 0,05). Estos valores fueron de 9,22 ± 3,3 para 5% de CO₂ y de 6,36 ± 2,09 para 20% de CO₂. Para el resto de las frecuencias no se observaron diferencias significativas (figs. 1 y 2).

Fatigabilidad

La fuerza de contracción se midió a los 5, 10 y 15 minutos del proceso de fatiga, y se obtuvieron los siguientes resultados: a) para 5% de CO₂ la fuerza descendió a 71,3 ± 4,8, 60,2 ± 7,3 y 57,4 ± 10,8% del inicio de fatiga; b) para 10% de CO₂ el descenso fue de 60,1 ± 7,8, 51,3 ± 8,2 y 43,8 ± 10,5, y c) para CO₂ de 20% fue de 50,8 ± 11,8, 35,6 ± 8,2 y

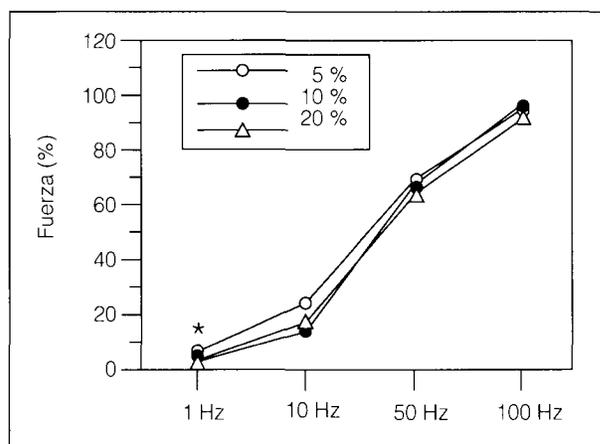
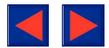


Fig. 1. Fuerza de contracción, expresada en porcentaje de contracción a 100 Hz 5% de CO₂, obtenida con diferentes frecuencias de estímulo (Hz) y diferentes concentraciones de CO₂. Sólo fue significativa (*) la diferencia con 1 Hz y entre 5 y 20% de CO₂.



28,3 ± 7,2 a los 5, 10 y 15 minutos. Todos estos fueron estadísticamente diferentes ($p < 0,05$). Esto indica una mayor fatigabilidad del músculo a lo largo del proceso de fatiga a medida que se aumenta la concentración de CO₂ (fig. 3).

Discusión

Este estudio demuestra que incrementos de PCO₂ de 29 mmHg (5%) a 102 mmHg (20%) producen una significativa disminución en la fuerza de contracción de un 25% cuando se estimula a 1 Hz y que los incrementos de PCO₂ de 29 a 48 y a 102 mmHg hacen que el músculo sea más susceptible a la fatiga, produciéndose un descenso más rápido de la fuerza de contracción ante un estímulo repetitivo.

En el modelo experimental se han procurado usar ratas de bajo peso, lo que hace que el espesor del diafragma sea de menos de 0,5 mm. Con ello se obvia la necesidad de manipular las tiras de diafragma para hacerlas más estrechas, como preconiza Viires⁸, lo que supone una mayor manipulación de la preparación y un manejo más difícil. Fitzgerald⁴ ha trabajado con un modelo experimental similar al nuestro usando ratas de igual o mayor peso y con hemidiafragma (más ancho que en nuestro montaje) y ha obtenido variaciones en la contractilidad del diafragma con variaciones de pH en el baño de órganos tanto por variaciones de CO₂ como de bicarbonato. También ha demostrado diferentes efectos de fármacos (salbutamol) en el baño de órganos sobre la contractilidad del diafragma. Todo ello implica que siendo el grosor del diafragma menor de 0,5 mm, la anchura de la tira diafragmática no tiene importancia y la difusión de CO₂ y de la mayoría de fármacos está asegurada.

Para explicar el efecto de las variaciones del CO₂ sobre la contractilidad del músculo habría que basarse en presumibles cambios en el pH intracelular y la posible influencia que estos cambios deben tener en el mecanismo contráctil. Hay numerosos estudios que miden el efecto de la acidosis y alcalosis extracelular sobre el pH intracelular en diferentes animales que tienen distinta composición iónica, lo que hace suponer que manejaran de diferente manera las variaciones de la concentración de hidrogeniones, y por tanto del pH, por lo que es muy probable que haya diferencias entre especies. Centrándonos en el diafragma de rata, Adler^{9,10} no encontró cambios en el pH intracelular al introducir cambios en el pH extracelular entre 7,4 y 6,9 (por disminución del CO₂H-extracelular) o entre 7,4 y 7,15 (con aumento del CO₂). Zhang¹¹ con diafragma de hámster no encuentra tampoco variaciones del pH intracelular variando el extracelular entre 6,8 y 7,8 merced a cambios en la pCO₂ del medio y usando la técnica no invasiva del rojo neutro. Sin embargo, Roos¹² y González¹³ encuentran una relación lineal entre las variaciones del pH intracelular y del pH extracelular, siendo esta relación de 0,5. Es posible que además de existir una probable explicación a estas discrepancias por diferencias entre especies, también el modelo experimental debe influir ya

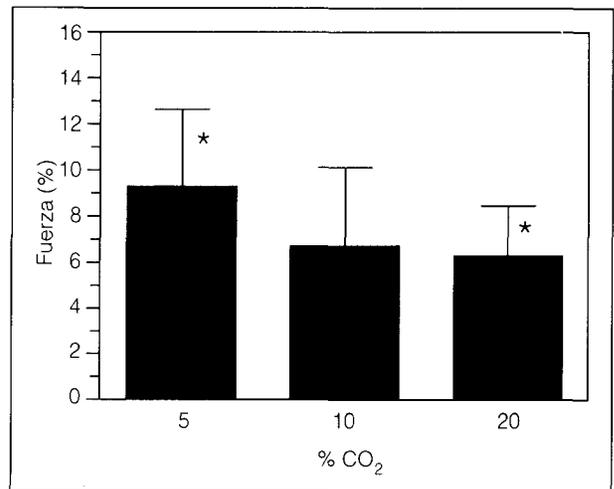


Fig. 2. Fuerza de contracción, expresada en porcentaje de la obtenida con 100 Hz y 5% de CO₂, con estímulo de 1 Hz y con 5, 10 y 20% de CO₂. Hay diferencias significativas (*) sólo entre 5 y 20% ($p < 0,05$).

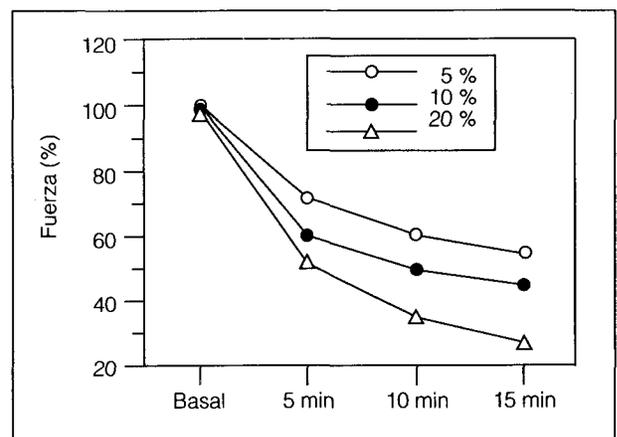


Fig. 3. Proceso de fatiga. Fuerza de contracción, expresada en porcentaje de la del inicio de fatiga, obtenida con estímulos repetidos (véase texto) con diferentes concentraciones de CO₂ y a los 5, 10 y 15 minutos del inicio del proceso. Los valores obtenidos con las diferentes concentraciones de CO₂ son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

que en el trabajo de Zhang el aumento del CO₂ se hace paulatina y lentamente a lo largo de 60-90 min, mientras que en otras experiencias como la nuestra los cambios de CO₂ se introducen bruscamente midiendo su efecto a los 15 min.

Los mecanismos a través de los cuales las variaciones de pCO₂ disminuyen la contractilidad del músculo se basan fundamentalmente pues en su capacidad de reducir el pH intracelular, el cual a su vez produce los siguientes efectos en la contractilidad: a) aumento de la afinidad del Ca⁺⁺ por el retículo sarcoplásmico por lo que disminuye el Ca⁺⁺ libre¹⁴; b) disminución de la afinidad de la troponina por el Ca⁺⁺¹⁵, y c) inhibir la fosfofructocinasa por lo que disminuye la síntesis de ATP¹⁶. También la disminución del pH extracelular podría actuar a través de una disminución del potasio intracelular y con ello del potencial transmembrana¹⁷.



Con respecto a los resultados obtenidos que indican que únicamente con 1 Hz se observa una disminución significativa de la fuerza de contracción con 20% de CO₂ hablarían en favor de un mecanismo dependiente de la frecuencia y en oposición con los resultados de Schnader que obtiene una disminución de fuerza de contracción en todas las frecuencias, siendo más intensa a frecuencias altas. La explicación debe estar en que se han usado modelos experimentales diferentes. Schnader ha usado animal in vivo, estimulando el nervio frénico por lo que también interviene la unión neuromuscular en el proceso, mientras que en el músculo in vitro la estimulación es directa sobre el músculo, sin existir placa neuromuscular. Dado que la contracción a altas frecuencias depende en parte de la transmisión neuromuscular¹⁸, es lógico pensar que cualquier efecto del CO₂ sobre ella sólo se podrá detectar en el modelo de estimulación sobre el nervio frénico y por ello es probable que además de los mecanismos de actuación del CO₂ ya descritos, éste debe de actuar dificultando la transmisión del estímulo a través de la unión neuromuscular, lo que explica el descenso de fuerza a altas frecuencias en modelo de Schnader. Por otra parte a altas frecuencias la fibra muscular está saturada de Ca⁺⁺ (el Ca⁺⁺ disponible para el proceso de excitación-contracción es proporcional a la frecuencia de estimulación¹⁹) y por ello el efecto del CO₂ sobre la afinidad del retículo sarcoplásmico y troponina sobre el Ca⁺⁺ se debe atenuar hasta no ser significativo, siempre que se estimule directamente el músculo.

La mayor fatigabilidad muscular es significativa a todos los niveles del CO₂ y aumenta de forma paralela a su incremento. La explicación de este efecto se da a partir de dos mecanismos: por un lado, por la disminución de contractilidad que produce la hipercapnia, y por otro, y fundamentalmente, debido a un bloqueo de la síntesis de ATP a través de la inhibición de la fosfofructocinasa, que es dependiente del pH como ya se ha comentado¹⁶. Estos resultados coinciden con los de Schnader⁶ y G. Juan⁵ con modelos in vivo.

La repercusión clínica de estos hallazgos se ha descrito en otros trabajos. Se ha apuntado hacia el agravamiento de la hipercapnia por propio efecto del CO₂ sobre el diafragma, que puede llevar al paciente a un círculo vicioso del que sólo saldrá con ventilación mecánica y corrección de los desequilibrios hidroelectrolíticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Steenberg Ch, Deleewen G, Rich T, Williamson JR. Effects of acidosis and ischemia on contractility an intracellular pH of rat heart. *Circulation Research* 1977; 41: 849-858.
2. Hermasen L. Effect of acidosis on skeletal muscle performance during maximal exercise in man. *Bull Europ Physiopath Resp* 1979; 15: 229-238.
3. Mainwood GW, Cechetto D. The effect of bicarbonate concentration on fatigue and recovery in isolated rat diaphragm muscle. *Can J Physiol Pharm* 1980; 58: 624-632.
4. Fitzgerald RS, Hauer GG, Bierkamer M, Raff H. Responses of in vitro rat diaphragm to changes in acid-base environment. *J Appl Physiol* 1986; 57: 1.202-1.210.
5. Juan G, Tálamo C, Schnader J, Roussos C. Effect of carbon dioxide on diaphragmatic function in human beings. *N Engl J Med* 1984; 310: 874-879.
6. Schnader J, Juan G, Howell S, Fitzgerald R, Roussos C. Aterial CO₂ partial pressure affects diaphragmatic function. *J Appl Physiol* 1985; 53: 823-829.
7. Altose N. Respiratory muscles in COPD patients. *Am Rev Respir Dis* 1977; 231: 528-532.
8. Viires N, Aubier M, Murciano D, Marty C, Pariente R. Effects of Theophylline on isolated diaphragm fibers. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: 1.060-1.064.
9. Adler S, Roy A, Relman AS. Intracellular acid-base regulation I. The response of muscle cells to changes in CO₂ tension and extracellular bicarbonate concentration. *J Clin Invest* 1965; 44: 8-20.
10. Adler S, Roy A, Relman AS. Intracellular acid-base regulation II. The interaction between CO₂ tension and extracellular bicarbonate in determination of muscle cell pH. *J Clin Invest* 1965; 44: 21-30.
11. Zhang R, Kelsen SG, Lamanna JC. Measurement of intracellular pH in hamster diaphragm by absorption spectrophotometry. *J Appl Physiol* 1990; 68: 1.101-1.106.
12. Roos A, Boron WF. Intracellular pH. *Physiol Rev* 1981; 61: 296-434.
13. Gonzalez NC, Gerbrandt M, Brown EB. Changes in skeletal muscle cell pH during graded changes in PCO₂. *Respir Physiol* 1975; 23: 243-255.
14. Nakamaru Y, Schwartz A. Possible control of intracellular calcium metabolism by hydrogen ion concentration. *Biochem Biophys Res Commun* 1970; 41: 830-838.
15. Fuchs F, Reddy Y, Briggs FN. The interaction of cations with the calcium-binding site of troponin. *Biochem Biophys Acta* 1970; 221: 407-409.
16. Hermasen L. Effects of metabolic changes on force generation in skeletal muscle during maximal exercise. En: Poster R, Whelan J, editores. *Human muscle fatigue: physiological mechanisms*. Ciba Foundation Symposium 82. Londres: Pitman Medical, 1981; 75-88.
17. Lade R, Brown E. Movement of potassium between muscle and blood in response to respiratory acidosis. *Amer J Physiol* 1963; 204: 761-764.
18. Edwards RHT. Physiological analysis of skeletal muscle weakness and fatigue. *Clin Sci Mol Med* 1978; 54: 463-470.
19. McAfee D. Calcium currents in excitable membranes. *Federation Proc* 1981; 40: 2.218-2.219.