

The background is a complex, abstract composition. On the left, there is a vertical strip with a red and white wavy, textured pattern. The rest of the background is dominated by a large, expressive painting in shades of green, yellow, and brown, with visible brushstrokes. In the upper right corner, there is a small, detailed illustration of a person's head and shoulders, possibly a classical or religious figure, rendered in a more traditional style. The overall aesthetic is a blend of modern abstract art and classical representation.

# Disfunció Muscular en Malalts amb Malaltia Pulmonar Obstructiva Crònica

Carlos Coronell Coronell

**Universitat Pompeu Fabra**

Departament de Ciències Experimentals i de la Salut  
Àrea de Coneixement de Fisiologia

**Memòria de Tesi Doctoral**

per optar al títol de  
**Doctor en Ciències de la Salut i de la Vida**

**Disfunció Muscular  
en Malalts amb  
Malaltia Pulmonar  
Obstructiva Crònica  
(MPOC)**

**Elaborada i presentada per**  
Carlos G. Coronell Coronell

**Directors**

Dr. Mauricio Orozco-Levi  
Dr. Joaquim Gea i Guiral

**CEXS, Universitat Pompeu Fabra,  
Unitat de Recerca en Múscul i Aparell Respiratori (URMAR),  
Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM);  
Servei de Pneumologia, Hospital del Mar**

**Barcelona, 2006**



**Universidad Pompeu Fabra**

Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud  
Área de Conocimiento de Fisiología

**Memoria de Tesis Doctoral**

para optar al título de  
**Doctor en Ciencias de la Salud y de la Vida**

**Disfunción Muscular  
en pacientes con  
Enfermedad Pulmonar  
Obstructiva Crónica  
(EPOC)**

**Elaborada y presentada por**  
Carlos G. Coronell Coronell

**Directores**

Dr. Mauricio Orozco-Levi

Dr. Joaquim Gea i Guiral

**CEXS, Universidad Pompeu Fabra,  
Unidad de Investigación en Músculo y Aparato Respiratorio (URMAR),  
Instituto Municipal de Investigación Médica (IMIM);  
Servicio de Pneumología, Hospital del Mar**

**Barcelona, 2006**



## **a Viviana ...**

***“...Y si el río se lleva el puente,  
busco otro modo de verte,  
porque pa'l cariño mío,  
nada importa un río crecio'...”***

*La Creciente del Cesar  
de Rafael Escalona Martínez,  
Juglar del folklore del Caribe Colombiano.*

***“...You may say I'm a dreamer  
but I'm not the only one...”***

*Imagine by John Lennon*



# ÍNDICE

---

ABREVIATURAS.....	vii
DEDICATORIA.....	ix
AGRADECIMIENTOS.....	xi
MOTIVACIÓN.....	xvii
SUBVENCIONES.....	xxi
NOTA PRELIMINAR.....	xxiii
DISTINCIONES.....	xxvii

## CAPÍTULO 1

### LA ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA

DEFINICIÓN.....	1
CLASIFICACIÓN DE LA GRAVEDAD.....	1
ASPECTOS HISTÓRICOS.....	2
Generalidades.....	2
El hábito de fumar.....	2
Las enfermedades respiratorias debidas al tabaco.....	7
EPIDEMIOLOGÍA.....	9
Factores de riesgo.....	9
Prevalencia y morbimortalidad.....	10
Impacto socioeconómico.....	11

## CAPÍTULO 2

### LOS MÚSCULOS EN INDIVIDUOS SANOS..... 13

GENERALIDADES.....	13
HISTOLOGÍA DE LOS MÚSCULOS ESQUELÉTICOS.....	13
La unidad contráctil muscular.....	14
Sistema tubular.....	16
Membrana celular muscular.....	16
Núcleos de las células musculares.....	16
La placa motora.....	17
POTENCIAL DE ACCIÓN Y CONTRACCIÓN MUSCULAR.....	18
La unidad motora.....	19
Energía involucrada en la contracción muscular.....	19

## CAPÍTULO 3

### LOS MÚSCULOS RESPIRATORIOS EN INDIVIDUOS SANOS

GENERALIDADES.....	21
MÚSCULOS INSPIRATORIOS.....	21
Diafragma.....	21



Los músculos intercostales externos .....	25
Los músculos intercostales paraesternales .....	25
LOS MÚSCULOS ESPIRATORIOS .....	25
MÚSCULOS ACCESORIOS DE LA RESPIRACIÓN.....	26
TÉCNICAS PARA LA EVALUACIÓN FUNCIONAL DE LOS MUSCULOS RESPIRATORIOS .....	26
Pruebas para evaluar la fuerza de los músculos respiratorios.....	27
Evaluación de la reserva funcional de los músculos respiratorios deducidas a partir de las mediciones de fuerza .....	30
Pruebas generales para evaluar la resistencia de los músculos respiratorios .....	31
Pruebas específicas para evaluar la resistencia de los músculos respiratorios .....	32
Resistencia del grupo de músculos espiratorios.....	33
Interpretación de las pruebas de resistencia muscular respiratoria: La claudicación y sus criterios.....	33

## **CAPÍTULO 4**

<b>LOS MÚSCULOS PERIFÉRICOS EN INDIVIDUOS SANOS .....</b>	<b>35</b>
DEFINICIÓN DEL CONCEPTO DE “MÚSCULOS PERIFÉRICOS” .....	35
Deltoides.....	35
Tibial anterior .....	36
Músculo cuádriceps .....	37
EVALUACIÓN FUNCIONAL DE LOS MÚSCULOS PERIFÉRICOS .....	39
Fuerza muscular .....	39
Evaluación de la fuerza del cuádriceps.....	43
Resistencia muscular.....	43

## **CAPÍTULO 5**

<b>LOS MÚSCULOS ESQUELÉTICOS EN ENFERMOS CON EPOC.....</b>	<b>47</b>
RELACIÓN ENTRE LA EPOC Y LOS MUSCULOS RESPIRATORIOS.....	47
Cambios funcionales .....	47
Cambios estructurales.....	48
Cambios estructurales del músculo diafragma .....	48
Cambios estructurales del músculo intercostal externo.....	49
Cambios funcionales y estructurales de los músculos espiratorios.....	49
RELACIONES ENTRE LA EPOC Y LOS MÚSCULOS PERIFÉRICOS .....	49
Cambios funcionales .....	49
Alteración de la fuerza de los músculos periféricos .....	50
Alteración de la resistencia de los músculos periféricos .....	51
Cambios estructurales del músculo cuádriceps .....	51
Cambios estructurales del músculo deltoides.....	52
Cambios estructurales del músculo tibial anterior .....	52
FACTORES SISTÉMICOS DE LA EPOC IMPLICADOS EN LA DISFUNCIÓN MUSCULAR GLOBAL .....	52

## **CAPÍTULO 6**

<b>ESTUDIOS ORIGINALES DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>55</b>
NOTA PRELIMINAR .....	55
Estudio 1, Síndrome de bajo peso asociado a la EPOC en nuestro medio .....	57
Hipótesis y Objetivos .....	57
Carta al Editor .....	63
Estudio 2. Relevance of assessing quadriceps endurance in patients with COPD .....	64
Hipótesis y Objetivos .....	64
Estudio 3. Injury of peripheral muscles in susceptible smokers with Chronic Obstructive Pulmonary Disease .....	73
Hipótesis y Objetivos .....	73
Estudio 4. Upregulation of proinflammatory cytokine gene in external intercostals muscles of COPD patients .....	114
Hipótesis y Objetivos .....	114

## **CAPÍTULO 7**

<b>RESUMEN DE RESULTADOS .....</b>	<b>145</b>
------------------------------------	------------

## **CAPÍTULO 8**

<b>DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>147</b>
ASPECTOS METODOLÓGICOS GENERALES	
DE LAS INVESTIGACIONES INCLUIDAS EN ESTA MEMORIA.....	147
Comentarios respecto de la coherencia de los estudios.....	147
Comentarios respecto de la relevancia de los interrogantes formulados .....	147
Comentarios respecto a la identificación y reclutamiento de pacientes .....	148
Comentarios respecto a la potencial aplicabilidad clínica .....	148
ASPECTOS CONCEPTUALES GENERALES	
DE LAS INVESTIGACIONES INCLUIDAS EN ESTA MEMORIA.....	149
¿Por qué tiene interés estudiar los músculos de pacientes con EPOC? .....	149
¿Qué aportaciones novedosas hace la presente memoria de tesis doctoral?.....	150
Aportaciones concretas respecto a la fatiga y debilidad muscular en pacientes con EPOC .....	150

## **CAPÍTULO 9**

<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>153</b>
---------------------------	------------

## **CAPÍTULO 10**

<b>EXPECTATIVAS FUTURAS.....</b>	<b>155</b>
----------------------------------	------------

<b>PÓSTERS .....</b>	<b>157</b>
----------------------	------------

<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>161</b>
--------------------------	------------



## ABREVIATURAS

- 1-RM:** Técnica de una repetición máxima.
- 10-RM:** Método de diez repeticiones máximas.
- 5-RM:** Método de cinco repeticiones máximas.
- ADN:** ácido desoxirribonucleico.
- ADP:** Adenosín difosfato.
- AMS:** Estimulación Magnética Anterior, del inglés *Anterior Magnetic Stimulation*.
- ARN:** ácido ribonucleico.
- ARNm:** ácido ribonucleico mensajero.
- ATP:** Adenosín trifosfato.
- ATS:** Sociedad Americana del Tórax, del inglés *American Thoracic Society*.
- BAMPS:** Estimulación Magnética Bilateral Anterior del Nervio Frénico, del inglés *Bilateral Anterior Magnetic Phrenic Stimulation*.
- CMS:** Estimulación Magnética Cervical, del inglés *Cervical Magnetic Stimulation*.
- COPD:** *Chronic Obstructive Pulmonary Disease*.
- COX:** Citocromoxidasas.
- DALY's:** suma de años perdidos debido a mortalidad prematura y años vividos en discapacidad, ajustados por gravedad, del inglés *Disability Adjusted Life Year*.
- DL<sub>CO</sub>:** Capacidad de difusión del monóxido de carbono, del inglés *diffusing capacity of the lung*.
- DQβ1:** Alelo del complejo mayor de histocompatibilidad clase II.
- EEUU:** Estados Unidos de América.
- E<sub>ALM</sub>:** Energía almacenada.
- Ef:** Eficiencia.
- E<sub>LIB</sub>:** Energía liberada.
- ELISA:** Inmunoensayo enzimático, del inglés *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*.
- EMG:** Electromiografía.
- ENIGMA:** *European Network for Investigating the Global Mechanisms of Muscle*.
- ERS:** Sociedad Respiratoria Europea, del inglés *European Respiratory Society*.
- EPOC:** Enfermedad Pulmonar Obstruictiva Crónica.
- FEV<sub>1</sub>:** volumen espiratorio forzado en el primer segundo, del inglés *Forced Expiratory Volume in one second*.
- FEV<sub>1</sub>/FVC:** Cociente respiratorio.
- fEMG:** Frecuencia mediana en la electromiografía.
- FUCAP:** *Fundació Catalana de Pneumologia*.
- FVC:** capacidad vital forzada, del inglés *Forced Vital Capacity*.
- GBD:** Carga Global de la Enfermedad, del inglés *Global Burden Disease*.
- H/L:** Índice de frecuencias altas/bajas medidas mediante EMG, del inglés *high-to-low frequency ratio (H/L)*.
- HK:** Hexoquinasa, del inglés *Hexokinase*.
- HLA:** Antígeno de Leucocitos Humanos, del inglés *Human Leukocyte Antigen*.
- ICFES:** Instituto Colombiano para el Fomento de la Educación Superior.
- IL-1β:** Interleucina 1 beta.
- IL-6:** Interleucina 6.
- IL-10:** Interleucina 10.
- IMC:** Índice de Masa Corporal.
- IMIM:** *Institut Municipal d'Investigació Mèdica*.
- K<sub>CO</sub>:** Coeficiente de transferencia del monóxido de carbono.
- LDH:** Deshidrogenada láctica, del inglés *Lactic Dehydrogenase*.
- MHC:** Cadena pesada de la miosina, del inglés *Myosin Heavy Chain*.
- MMD:** Masa muscular del diafragma.
- MMR:** índice de relajación máxima, del inglés *Maximum Relaxation Rate*.
- OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- PAS:** Tinción de Ácido Periodico Schiff, del inglés *Periodic Acid Schiff*.
- Pdi:** Presión transdiafragmática.
- Pdi<sub>max</sub>:** Presión transdiafragmática máxima.
- Pdi<sub>max-Müller</sub>:** Presión transdiafragmática máxima, durante una maniobra de inspiración forzada contra la vía aérea cerrada.
- Pdi<sub>max-Sniff</sub>:** Presión transdiafragmática máxima, durante una maniobra de aspiración nasal.
- Pdi<sub>max-TLC</sub>:** Presión transdiafragmática máxima, durante una maniobra de inspiración máxima hasta Capacidad Pulmonar Total.
- Pdi<sub>max-Twitch</sub>:** Presión transdiafragmática máxima, durante estimulación externa, ya sea eléctrica o magnética.
- Pdi<sub>ToS</sub>:** Presión transdiafragmática, durante la maniobra

de tos.

**PEEPi:** Presión intrínseca positiva al final de la espiración, del inglés *intrinsic positive end-expiratory pressure*.

**PE<sub>max</sub>:** Presión espiratoria máxima.

**Pes:** Presión esofágica.

**Pes<sub>max</sub>:** Presión inspiratoria máxima medida en esófago.

**Pes<sub>Tos</sub>:** Presión inspiratoria máxima medida en esófago, durante la maniobra de tos.

**PENAM:** *Pan-European Network for Aging Muscle and Associated Diseases*.

**Pga:** Presión gástrica.

**Pga<sub>Tos</sub>:** Presión inspiratoria máxima medida en estómago, durante la maniobra de tos.

**PI:** Presión inspiratoria.

**PI<sub>max</sub>:** Presión inspiratoria máxima.

**PMT:** Presión Máxima Tolerada.

**Q:** Flujo sanguíneo.

**Q<sub>MVC</sub>:** Contracción voluntaria máxima del cuádriceps, del inglés *quadriceps maximum voluntary contraction*.

**Q<sub>Tlim</sub>:** Tiempo de aguante o límite del cuádriceps, del inglés *Quadriceps Time limit*.

**ROM:** Rango de movimiento, del inglés *Range of movement*.

**RT-PCR:** Retrotranscripción-Reacción de la polimerasa en cadena.

**RV:** Volumen residual, del inglés *Residual Volume*.

**SEP:** Presión espiratoria sostenible, del inglés *Sustainable expiratory pressure*.

**SEPAR:** Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica.

**SIDA:** Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

**SIP:** Presión inspiratoria sostenible, del inglés *Sustainable inspiratory pressure*.

**SPf<sub>66</sub>:** Vacuna sintética contra la malaria, del inglés *Synthetic Plasmodium falciparum, 66 MW*.

**T<sub>i</sub>:** Tiempo inspiratorio.

**TLC:** Capacidad pulmonar total, del inglés *Total Lung Capacity*.

**T<sub>lim</sub>:** Tiempo límite.

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa, del inglés *Tumor Necrosis Factor alpha*.

**TT<sub>i</sub>:** Índice Tensión-Tiempo.

**TTdi:** Índice Tensión-Tiempo del diafragma.

**T<sub>TOT</sub>:** Tiempo total del ciclo respiratorio.

**UMS:** Estimulación Unilateral del Nervio Frénico, del inglés *Unilateral Magnetic Stimulation*.

**UPF:** *Universitat Pompeu Fabra*.

**URMAR:** *Unitat de Recerca en Múscul i Aparell Respiratori*.

**WHO:** World Health Organization.

**W<sub>mus</sub>:** Trabajo muscular, del inglés *Work of muscle*.

**YLDs:** Años Vividos con Incapacidad, del inglés *Years Lived with Disability*.

*A Pachín, por legarme su Inocencia,  
A Edith, que me regaló la Vida,  
A Viviana, por mantener mi Ilusión de Existir,  
A Norellita, por Comunicarse Siempre,  
A Carlitos, que ha Empezado a Entender la Vida,  
A Marianella, quien ya no me Ignora,  
A Laia, por Regalarme su Presencia con Sonrisas.*



## AGRADECIMIENTOS

---

Hay tanto que agradecer, y tan poco espacio para hacerlo, que será imposible plasmar en estas pocas líneas mi gratitud a todas las personas que han colaborado para la realización de esta Tesis Doctoral.

Agradezco sobretodo a mi madre, **“La Niña Edith”**, que me brindó la oportunidad de vivir, que me impulsó desde niño en todo lo referente a estudios, luchó por conseguir todo lo necesario para que me licenciara en Medicina. La pobre se quedó sin médico en casa, pues me fui a trabajar en el desarrollo de vacunas sintéticas en Bogotá, y dejé atrás Barranquilla y el resto de mi familia; de eso **Mami**, hace ya 18 años, 18 años que no estoy en casa, y todo por querer dedicarme a la investigación médica. Te has quedado solamente con mis profesores, mis amigos egresados de la facultad y mis estudiantes de la Universidad Metropolitana, a quien puedes consultar “tus dolencias”. Con mi corazón en la mano, te digo **“Gracias Mami”**.

Le agradezco a **Vicente**, mi padre, **“el muchacho de Juan de Acosta”**, el ultraconocido **“Pachín”**, quien me enseñó a ser paciente, a ver la vida con calma, a perseverar, a no darme por vencido y a no perder la inocencia infantil.

Agradezco a mis hermanos, **Mariade** y **Georgie**, que me permitieron participar de sus estudios con sus compañeros, cuando demoraban horas estudiando en casa con libros de anatomía y huesos humanos comprados en el Calan-Cala. Ellos se licenciaron en Bacteriología (una licenciatura de Biología Clínica o Médica) y Odontología, respectivamente; durante casi toda su carrera me brindaron su apoyo y conocimientos para que yo empezara y terminara con éxito mi licenciatura de Medicina.

Agradezco a **Pilar**, mi hermana menor, mi actual cómplice con mis hijos por toda su colaboración en mantener una comunicación que me permite seguir estando al lado de ellos, a pesar de la distancia.

Agradezco a **Jimena Del Castillo**, mi única cuñada, quien en todo momento me ha brindado su amistad y siempre estuvo dándome ánimos para empezar esta Tesis Doctoral.

Agradezco a mis tres hijos en Colombia por existir **Norellita**, **Carlitos** y **Marianella**, ya que sois el motor primordial de mi vida; siempre os llevo en mi pensamiento y a pesar que no podeis estar en estos momentos conmigo, siempre estáis en mí y me desarrollo gracias a Ustedes.

Agradezco a **Viviana Belalcazar Guerrero**, mi gran amor, la persona que me ha ayudado a hacer mi hogar en Barcelona. Sin **Vivi**, nada habría escrito. Mis estudios, esta Tesis Doctoral, se la debo íntegramente a ella y se la dedico en su totalidad. De nuevo gracias **“Linda”** por apostar por nuestro amor. También te agradezco por brindarme a **Laia**, mi actual ilusión, **“La Chiquitina más Linda del Mundo”**, la felicidad de nuestro hogar. Por **Laia**, jamás podré agradecerte todo lo necesario.



Agradezco a mi familia adoptiva, la familia de Viviana, **Don Alirio, Doña Gloria**, y a **Alex** y su esposa **Susana**, personas que me han brindado un afecto inapreciable, mi nueva familia que siempre nos ha apoyado desde la distancia.

Agradezco al **Dr. Tomás Molina Ramos**, quien fue la primera persona que se interesó en mi formación científica y me inició en este campo de manera desinteresada y gentil.

Agradezco especialmente al **Dr. Manuel Elkin Patarroyo Murillo**, quien fue como un padre a pesar de ser “El Jefe”, durante mis años de iniciación en la investigación biomédica en el **Instituto de Inmunología del Hospital San Juan de Dios de Bogotá (Colombia)**. De él aprendí a manejar objetivos de vida y a valorar el sentido de la realidad. Al hablar del Instituto quiero agradecer a todos mis excompañeros de esa época, hablo de los años 1988 a 1995, y de los que aprendí tantas cosas. Jamás podré olvidarme del grupo de Lepra constituido por **Ricardo Tascón, Javier Burgos, Carlos Fajardo, Eulogia Román**, al “compadre” **José Fernando Velásquez** y su esposa **Natalia Valencia, Lina Franco, Vicky Valero, Nelsón Salazar, William Gutiérrez**. Todas estas personas han influido en gran manera en mi formación en el Instituto de Inmunología. Además, no puedo dejar de nombrar a la **Dras. Fanny Guzmán, Luz Mary Salazar, Fabiola Espejo y Diana Lozada**, quienes me aclararon el mundo químico de los péptidos sintéticos.

Agradezco el apoyo infinito que me prestó el **Dr. Eduardo Acosta Bendek**, Rector de la **Universidad Metropolitana de Barranquilla (Colombia)**, durante mi estancia como docente e investigador en la Facultad de Medicina. Sin él no se hubiera podido empezar esta tesis, pues me impulsó a realizar el doctorado en España y me financió durante los primeros meses de mi estancia en Barcelona. Y al hablar de España, el **Dr. Jesús Sáez de Ibarra** (Vicerrector de la Universidad Metropolitana) y su esposa la **Dra. Emilia de Sáez de Ibarra** (Directora del Centro de Extensión Cultural de la Universidad Metropolitana), dos españoles, él de Bilbao y ella de Granada, los que me llenaron de ilusiones para que yo decidiera iniciar mi doctorado en la “Madre Patria”. A ellos y a las reuniones en su casa debo parte de mi resolución a iniciar mi doctorado aquí.

Agradezco de manera especial a todo el grupo que formaba el **Laboratorio de Inmunología y Genética de la Universidad Metropolitana**, la **Dra. Ana María Segura Rosero**, persona infinitamente espiritual que me escuchaba y aconsejaba de manera noble. Además, tengo que agradecerle muchos litros de Frosomal que comimos en la Heladería Americana de la calle 72 de Barranquilla. Sería ingrato si no agradeciera todo lo que me aportaron el **Dr. Helman Alfonso, Sarita Villalba, Elmy Tapias, Alberto Moreno, Carlos Silvera, Lourdes Varela y Doña Francisca**, personajes tan diferentes pero que me enriquecieron y acompañaron durante mi estancia en dicho laboratorio. Tampoco quiero dejar de mencionar aquí a una persona extremadamente esencial en mi vida como es **Ana María Brokate Llanos**: mi amiga, mi secretaria, mi confidente, mi compinche. A ella debo parte de este sueño y la animo para que también realice el suyo en la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla donde está cursando su doctorado, que ojalá pronto termine con satisfacción y vea los frutos de todo este esfuerzo, ya que de verdad vale la pena.

Agradezco al **Dr. Alfredo Cure Michaili** por brindarme su amistad desinteresada, tantas horas de charlas, tantas confidencias compartidas. Sin tí, mi amigo inventor, este sueño de doctorado no se hubiera realizado; ojalá tus sueños en nuestra querida “Curramba” se estén cumpliendo y consigas tus metas en corto tiempo.

Agradezco al **Dr. Edmond J. Yunis**, del **Departamento de Cáncer, Inmunología y SIDA de la Escuela de Medicina de la Universidad de Harvard y del Instituto de Cáncer Dana-Farber de Boston (EEUU)**, quien me acogió y enseñó en su laboratorio lo que ahora sé de inmunogenética. Del Dr. Yunis y de su esposa Borghild tengo gratos recuerdos en su casa. Jamás he conocido anfitriones tan espléndidos. Al Dr. Yunis que ha residido la mayor parte de su vida en EEUU, le agradezco que me regalara tantos momentos de su vida contados de manera anecdótica, con su lenguaje costeno, tan ameno y poético (recuerdo su legítima historia de la “Llorona Loca de Tamalameque”).

De mi estancia en Boston no puedo dejar de agradecer la hospitalidad y el cariño que me ofrecieron mis amigos del Instituto de Inmunología, como **Olga P. Clavijo** (Olguis), **Julio C. Delgado** y su esposa **Diana**, y **Januario E. Castro**. A todos ellos les debo muchos consejos y muchas horas de aclimatación e integración frente al “choque cultural” de la sociedad Norteamericana.

En Barcelona, a las primeras personas que tengo que agradecer es a **Juan Belles Chiva** y a su esposa **Rosario Cobos** (QEPD), quienes acogieron a Vivi y velaron por ella cuando yo no estaba, y cuando yo aparecí me brindaron su hogar y su cariño.

Agradezco a **Fernando Pueyo Muñoz** mi amigo catalán desde la infancia en el Colegio Biffi “La Salle” de Barranquilla, quien ha sido como un hermano en Barcelona, me ha socorrido en múltiples oportunidades y siempre ha estado ahí.

Agradezco la amistad que me encontré una madrugada en Workcenter con **Mariano Spinelii** y su esposa **Débora Gherstenfeld**, quienes vinieron desde Argentina a brindarnos su compañía y su afecto. A Mariano le debo tantos trucos del Adobe® Photoshop®. Muchísimas gracias por el diseño del póster que llevé a Estocolmo en el 2002 y por tu colaboración en la maquetación de esta Tesis Doctoral.

Ahora que hablo de **Workcenter**, no puedo dejar de agradecer a **Xavi Taberner, José Miguel Sánchez “Junior”**, a mi hada madrina **Natalia Mozzetti** y su hermano **Augusto, Xavi Raboso, Héctor, Marcos Carvahlo, Dani Cardoso, Cristina Comunas, Laura Esteban, Kurtis Negrin, Dani Montoliu, Merche Grillo, Carla Espejo, Gemma Mestre, Liuba Sorokina, Ana Durán, Elena Jover, David Esteban, Franco D’Andrea, David Llorach, Matías Delcalzo, Mariano Masei, Alex de Fuenmayor, Vicente Gazulla, Xavi Gómez, Pamela Moure, Paola Archbold, Eva Colomer, Alexander Da Silva, Irene García, Nuria Milià, Jordina Raboso, Dolores Álvarez, Jaume Pamies, Miguel Ángel González, Andrés Bernal, Silvia Cue**, y especialmente a **Kilia Melià**, quien en esta última etapa de la Tesis Doctoral ha dado su matiz de artista y un aura mágica a todas las gráficas. Gracias Kilia por enseñarme lo poco que sé de Photoshop® y Freehand®. En general, agradezco a todo el personal de Workcenter, empresa que me ha acogido tan bien durante varios años y me ha permitido acercarme a un mundo laboral desconocido para mí. Gracias a todos por brindarme vuestra amistad y por ayudarme a conocer el mundo de las artes gráficas.

Agradezco a **Paco Urraco**, quien ha sido mi soporte informático en estos tres últimos años, por todo el aprecio que me ha brindado y su ayuda inestimable al reparar casi en el acto mi ordenador, que se dañó durante la revisión del manuscrito de esta Tesis Doctoral.

Agradezco a **Francisca López**, quien se ha ganado el título de yaya sevillana de Laia, a quien ha cuidado desinteresadamente desde hace dos años. Además, nos ha brindado su cariño andaluz y nos ha hecho parte de su familia.

Agradezco a mis profesores de inglés, **Melinda McMahon, Cory Wees, Charles Anderson, Nicola Millership, Melissa Joseph**, y sobretodo a la única representante del grupo “las profes 4” **Susan Swenson**, mi actual tutora en la lengua de Shakespeare y la más brillante de todos. Gracias Susan por tu preocupación en la pronunciación y entonación con respecto a las presentaciones orales y pósters de Glasgow 2004.

En esta parte de los agradecimientos me acerco ahora al **Hospital del Mar** y sobre todo al **Servei de Pneumologia**. Aquí sí hay personas a quien agradecer y de las que jamás podré olvidarme. Empiezo por mi director de tesis y amigo, el **Dr. Mauricio Orozco-Levi**, neumólogo adjunto del **Servei de Pneumologia** del Hospital del Mar, a quien conocí hace cerca de 20 años en el Instituto de Inmunología en Bogotá y que por circunstancias del destino en el año 1998, después de volver de Boston, lo encontré en Barranquilla. Desde esa época, me insistió y animó a que realizara mi doctorado en Barcelona. Yo me lo pensé mucho y fue él quien con su perseverancia y actitud, gestó la situación propicia para que yo empezara el doctorado en la **Unitat de Recerca en Múscul i Aparrell Respiratori**, adscrita a la **Universitat Pompeu Fabra**. Mauricio ha hilado todos los conceptos y propuestas de esta Tesis Doctoral desde el inicio, ha dirigido esta etapa de mi vida con actitud noble, y a veces hasta paternalista, ha perseverado en las ideas, y gracias a él, hoy escribo estas líneas. Gracias compadre, gracias por mantener el optimismo y permitirme aprender de tí.

Agradezco infinitamente al **Dr. Joaquim Gea i Guiral**, Jefe del **Servei de Pneumologia** del Hospital del Mar y también director de esta tesis, quien me acogió en su **Grup de Recerca en Múscul** de la **Universitat Pompeu Fabra-IMIM**. De él he aprendido la tenacidad y el “espíritu agresivo” del que me hablaba el Dr. Yunis. Gracias Dr. Gea por tantos consejos y por guiarme en estos cinco años de **becario-precario**.

Agradezco al **Dr. Joan Maria Broquetas i Doñate**, Jefe Emérito del **Servei de Pneumologia** del Hospital del Mar, quien con su estilo de profesor docto y prudente me enseñó a acomodar mis pensamientos en todos estos años.

Agradezco al **Dr. Carles Sanjuas i Benito**, Jefe Adjunto del **Servei de Pneumologia** del Hospital del Mar, de quien he aprendido el trato fino y caballeroso hacia los pacientes.

Agradezco al **Dr. Victor Curull i Serrano**, Jefe de la **Secció de Broncofibroscopia** del **Servei de Pneumologia** del Hospital del Mar, todas las indicaciones que me ha dado en estos años.

Agradezco al **Dr. Miguel Félez i Flor**, Adjunto del **Servei de Pneumologia** del Hospital del Mar, quien durante una gran temporada amenizó mis solitarias tardes en el Laboratorio de Función Respiratoria con “profundas” *cyber-charlas* acerca de Megabites, Megapixels y otros tecnicismos. Además, se interesó en animarme a terminar pronto esta tesis y a abrir mis expectativas frente a un futuro horizonte laboral aún incierto. De él también he aprendido la prudencia y el espíritu crítico frente a la realidad. También le agradezco, infinitamente, todas las berlinas de chocolate a que me ha invitado durante mi entrenamiento pre-doctoral.

Agradezco a la **Dra. Eva Balcells i Vilarnau**, Adjunta del **Servei de Pneumologia** del Hospital del Mar, por sus grandes consejos durante mi permanencia en el servicio.

Agradezco la preocupación que la **Dra. Juana Martínez Llorens**, también adjunta del **Servei de Pneumologia** del Hospital del Mar, ha manifestado durante todos estos años de trabajar

juntos para que apure mi paso. Gracias Juana por tantos ratos agradables y por todo el apoyo que me has brindado desde que nos conocimos.

Agradezco a la **Dra. Luisa Blanco**, Adjunta del *Servei de Pneumologia* del Hospital Comarcal de Sant Boi, quien me animó de manera siempre sutil para que mi tesis tuviera frutos.

Agradezco especialmente a la **Dra. Alba Ramírez-Sarmiento**, Fisioterapeuta del *Servei de Pneumologia* del Hospital del Mar, quien ha sido mi apoyo incondicional durante todo este tiempo. Alba me ha ayudado, con actitud generosa, a evaluar cientos de pacientes. Además, ha sido patrocinadora de cientos de cafés.

Agradezco a **Albert Sánchez Font** y **Beti Abeijón Ynsúa**, del *Servei de Pneumologia*, con quienes he compartido tantos momentos en estos años y que han hecho más llevadero mi concurrir como becario.

Agradezco a las residentes del *Servei de Pneumologia*, **Marisol Domínguez Álvarez** e **Itziar Fuertes Vallcorba**, que con su agradable presencia han alegrado mis aburridas tardes de análisis estadístico.

Agradezco a **Raúl Méndez Vásquez**, Licenciado en Biología y compañero de doctorado durante varios años, quien me ha transmitido todos sus conocimientos de manera desinteresada y, sobretodo, con alegría panameña.

Agradezco al personal de *Servei de Patologia* del Hospital del Mar, especialmente al **Dr. Josep Lloreta i Trull** y la **Dra. Dolores Ferrer i Yabar**, quienes me han enseñado lo que hasta hoy sé de microscopía electrónica. A los técnicos **Luís Magan**, **Yolanda Núñez** y **Beatriz Casado**, quienes han colaborado en el procesamiento de todas las muestras de los pacientes.

Agradezco a la **Dra. Esther Barreiro i Portela**, coordinadora del Laboratorio de Biología de la *Unitat de Recerca en Múscul i Aparell Respiratori* del IMIM-UPF, toda la preocupación que ha tenido con respecto a esta tesis, los buenos consejos que me ha dado y el aprecio que me ha manifestado desde que nos conocimos.

Agradezco a la **Dra. Carme Casadevall i Fusté**, de la *Unitat de Recerca en Múscul i Aparell Respiratori*, que ha obtenido ADN, ARN y demás moléculas de cientos de músculos, incluyendo todos los de esta tesis, y que ha sido colaboradora en la realización de los frutos obtenidos en ella.

Agradezco especialmente el **Dr. Juan B. Gáldiz**, Adjunto del Servicio de Neumología del Hospital de Cruces de Barakaldo, País Vasco, quien ha sido coautor de varios de los trabajos expuestos aquí y que, además, siempre ha tenido un trato agradable y noble.

Agradezco especialmente a las enfermeras de Exploraciones Complementarias de Neumología **Nuria Soler i Vilalta** y **Ángela Roig i Andreu**, quienes durante todos estos años han evaluado a todos y cada uno de los pacientes que han participado en esta Tesis Doctoral. Además, tanto Nuria como Ángela, me han regalado kilos de chocolate que me han alegrado el alma.

Agradezco a todo el personal que forma parte de la *Unitat de Recerca en Múscul i Aparell Respiratori*, especialmente a **Francisco Sánchez Corredera** y **Sandra Mas Casillas**,

por todas las muestras que han ayudado a procesar en estos últimos meses; no puedo dejar de agradecer a los que ya no están en dicho grupo: guardo especial recuerdo de ellos como **Dolors Moyés, Núria Hernández Frutos, Mireia Peiró, Daniel Sánchez Centellas, Raúl Regalado, Beatriz de la Puente...**

Agradezco la paciencia infinita que ha tenido conmigo, la **Megasecretaria** del *Servei de Pneumologia* del Hospital del Mar, **Roser Pedreny i Ventura**, quien me ha ayudado tanto en lo profesional como en lo personal. Gracias Roser por ser como eres, y por ser tan desprendida y espléndida.

Por último, y no por ello menos importante, quiero agradecer la colaboración infinita y desinteresada que han prestado tanto **todos los pacientes** como los **controles sanos**, que han aceptado participar en mis protocolos durante mi período de formación pre-doctoral. Ojalá los datos que aquí se muestran, y las inquietudes que esta Tesis Doctoral genere nos permitan aliviar en un plazo mediano el sufrimiento que produce la EPOC.

## MOTIVACIÓN

---

Los primeros recuerdos que tengo de mi infancia me trasladan al pueblo de mi madre y mis abuelos (Piojó), donde me encontraba jugando con animales y “experimentando con insectos”. Luego al empezar los estudios primarios en el Colegio Biffi “La Salle” en Barranquilla, siempre me decanté por leer sobre biología y recuerdo que le pedía al Profesor Barros que me prestara los libros de experimentos en vacaciones para poder seguir con mi “pasatiempo” en ese período de descanso. Durante el bachillerato seguí con emoción la biología y la química y odiaba a muerte la física, las matemáticas, la trigonometría y demás secuaces “numerológicas”. Tanto que mi hermana me explicaba los teoremas y yo los repetía cientos de veces para poder pasar los exámenes finales de ese tipo de materias. Recuerdo que a mediados del bachillerato ya sabía que iba a estudiar Medicina: Mis hermanos habían empezado carreras afines y no quería repetir su camino y menos estudiar alguna ingeniería que me acercaría a mis odiados números. Así olvidé mi sueño de estudiar ingeniería electrónica.

Al ingresar en la Facultad de Medicina de la Universidad Metropolitana empecé a estudiar como funciona el cuerpo humano y como le afecta su relación con el medio-ambiente. También me di cuenta que la Medicina era una profesión que *“algunas veces cura, otras alivia y siempre acompaña”*, lo cual me decepcionó un poco. Sin embargo, a mitad de mi carrera universitaria a mediados de los ochenta asistí a un congreso médico local; donde los conferenciantes eran los Doctores Manuel Elkin Patarroyo Murillo y Tomás Cipriano Molina Ramos, y mi sueño de investigador empezó a estructurarse. El Dr. Molina resultó que era primo de mi padre y el Dr. Patarroyo era uno de los científicos más sobresalientes en Colombia. Ellos habían trabajado juntos y vi claramente que quería trabajar en investigación médica con el Dr. Patarroyo. Inmediatamente repasé el árbol genealógico y fuimos a casa del padre del Dr. Molina, quien me lo presentó y éste me ofreció de manera desinteresada su laboratorio de inmunología. Esto me serviría como entrenamiento previo a trabajar con el Dr. Patarroyo, mientras terminaba mi carrera de medicina. A partir de ese momento y durante 3 años dediqué mis “vacaciones” al Laboratorio de Inmunología de la Clínica Santa Rosa de Bogotá, donde Tomás me enseñaba a leer los ensayos de microcitotoxicidad con sueros de multíparas, pruebas de inmunoensayos enzimáticos (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISAS, de la sigla en inglés) para diagnosticar pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), determinaciones de complemento y otros ensayos que para mis compañeros de facultad eran ciencia-ficción.

Al terminar los estudios en la Facultad de Medicina, tenía que hacer el internado y por supuesto que la primera opción fue ingresar al grupo del Dr. Patarroyo. Pero no era fácil para un estudiante de provincia. Afortunadamente el Dr. Eduardo Acosta Bendek, Rector de la Universidad Metropolitana, y el Dr. Néstor Vásquez Macías, decano de su Facultad de Medicina en aquella época, me facilitaron todas las gestiones para que la Universidad Nacional de Colombia permitiera que yo empezara mi año de internado “especial” en el Instituto de Inmunología, bajo la supervisión del Dr. Patarroyo. De la mano de Ricardo Tascón empecé a usar las micropipetas, a realizar *ELISAS* con péptidos sintéticos para inmunodiagnóstico de lepra y tuberculosis, y *western blots* para el seguimiento de la respuesta inmunológica de los vacunados con la recién nacida vacuna sintética contra la malaria “**SPf<sub>66</sub>**”. El grupo de lepra se robustecía gracias a las do-

naciones de la **Germany Leprosy Relief Association** y del **Ministerio de Salud de Colombia**, así el grupo se dedicó sólo al inmunodiagnóstico de lepra y recuerdo meses interminables con William Gutiérrez preparando cientos de litros de *PBS-Tween*, “sembrando” miles de sueros de habitantes de Mogotes, Covarachía, Aratocha, el Valle de San José, ..., con Ricardo Tascón, Javier Burgos, José Fernando Velásquez, Lina Franco, Vicky Valero, Eulogia Román, Nelson Salazar, Carlos Fajardo ...

Por esa época el Instituto de Inmunología era ya muy conocido y cada semana teníamos visitantes de Europa, Norteamérica y de casi todo el mundo. Recuerdo que estuve colaborando dos meses con la Dra. Indira Nath, del **All India Institute of Medical Science** de Nueva Deli, que fue la primera persona que me preguntó quiénes eran los doctores del Instituto de Inmunología y, para su sorpresa, no había ni uno. Desde ese instante decidí que debía doctorarme. De hecho, algunos de los trabajos en los que había participado podían haber sido Tesis Doctorales. Empecé a escribir a muchas partes del mundo donde pudieran darme la oportunidad de trabajar y estudiar; de manera muy amable me respondían que había escasos fondos y que en algún momento se pondrían en contacto conmigo; creo que envié curricula a medio planeta con resultados infructuosos. Posteriormente se me presentó la oportunidad de coordinar el Laboratorio de Inmunología y Genética de mi Universidad Metropolitana. Con una honda pena me separé de mi querido Instituto de Inmunología y volví a mi tierra natal para encargarme de la disciplina de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Metropolitana.

En “**La Metro**” el Dr. Eduardo me dio todo su apoyo; allí me reencontré con mis antiguos profesores y conocí en el Laboratorio de Inmunología y Genética a personas por las que hoy siento un gran aprecio como son la Dra. Ana María Segura, el Dr. Helman Alfonso, las licenciadas Ana María Brokate, Sarita Villalba y Elmy Tapias. También conocí a cientos de estudiantes que me hicieron aprender inmunología, porque jamás he aprendido tanto como cuando estuve enseñando. A mediados de los años noventa la Universidad Metropolitana y el Instituto Colombiano para el Fomento de la Educación Superior (ICFES) me brindaron la oportunidad de entrenarme en Boston en el **Dana-Farber Cancer Institute**, adscrito a **Harvard University**, bajo la supervisión del Dr. Edmond J. Yunis. En Boston aprendí a tipificar las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I y II (HLA clase I y II) y empecé a entender algo de genética. Además, el Dr. Yunis me insistía en que debía ser más agresivo en investigación,... “actitud americana”. A Boston le debo reencontrarme con amigos del Instituto de Inmunología como Olga Clavijo, Julio Delgado y Enero Castro, también discípulos del Dr. Yunis y lo más importante, en Boston conocí a Viviana Belalcazar, mi esposa, quien había viajado a los Estados Unidos con intención de hacer un doctorado.

Después de terminar mi entrenamiento en Boston volví a mi querida Universidad Metropolitana en Barranquilla y para mi sorpresa me encontré que el Director de la Oficina de Postgrados y Estudios Avanzados era Mauricio Orozco, quien también había trabajado en el Instituto de Inmunología del Dr. Patarroyo. Con Mauricio estuvimos trabajando para organizar la parte de investigación de la Universidad Metropolitana y gastamos muchísimas horas en el proceso de autoevaluación y acreditación de la Facultad de Medicina de cara al ICFES. Finalmente Mauricio decidió volver a Barcelona y me animó para que hiciera mi doctorado en la **Universitat Pompeu Fabra**, en la **Unitat de Recerca en Múscul i Aparell Respiratori** del Dr. Joaquim Gea. Sin embargo, en ese instante mi situación personal me impidió viajar a Barcelona. La idea estuvo varios meses rondando en mi cabeza. A mediados del año 1999 asistí en Ámsterdam a un congreso de inmunología de mucosas, y de paso me quedé unos días en Barcelona. Conocí el mencionado

laboratorio de investigación en músculo del **Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM)** - **Universitat Pompeu Fabra** y el Laboratorio de Función Respiratoria del Hospital del Mar. Es aquí donde empecé a conocer sobre la investigación en músculos respiratorios y periféricos del grupo multidisciplinario dirigido por el Dr. Joaquim Gea.

Finalmente llegó el nuevo milenio y con él mi sueño de empezar mi doctorado en Barcelona. Recuerdo que llegué el 2 de enero del 2000, y empecé con mi ubicación física en el Laboratorio de Función Respiratoria del Hospital del Mar. Allí comencé a escuchar catalán, Nuria Soler repetía insistentemente “**bufi, bufi, bufi..., una mica més..., no pari, no pari**” y por primera vez en mi vida a empecé a tratar con pacientes, este hecho motivó un cambio radical en mí pues siempre había trabajado con “derivados de pacientes” (sangre, suero, plasma, linfocitos, ácido desoxirribonucleico [ADN]). Ahora me tocaba trabajar con los actores principales: Los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En esa época volví a recibir clases. Fueron 2 años de ser de nuevo un estudiante, de preparar exámenes, ... que desacostumbrado estaba.

De esto han pasado cerca de 5 años y he aprendido mucho desde entonces, tanto desde el punto de vista académico como personal. Mi formación en el **Unitat de Recerca en Múscul i Aparell Respiratori (URMAR)** del **IMIM – Hospital del Mar** ha sido fructífera para el grupo. Hasta hoy se han publicado dos artículos originales, una carta con resumen de un trabajo, y otros cuatro trabajos están en revisión por pares en revistas científicas internacionales. En los congresos de la Sociedad Respiratoria Europea (ERS, sigla en inglés) se han presentado durante este período 10 carteles (pósters) y 6 presentaciones orales; mientras que en la Sociedad Americana del Tórax (ATS, sigla en inglés) se han presentado 11 pósters y 2 presentaciones orales: A el Congreso Nacional de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) se ha participado con 3 presentaciones orales y 4 pósters.

Estoy seguro por tanto, que se ha aprovechado el tiempo y ahora, *ad portas* de defender esta Tesis Doctoral, me encuentro satisfecho con las aportaciones que hemos realizado para entender un poco más la fisiopatología de la EPOC, y con espíritu optimista para continuar mi ilusión de seguir investigando acerca de enfermedades que son grandes problemas de salud pública, pues limitan la calidad y expectativa de vida de las personas que las padecen.





## SUBVENCIONES

---

Los estudios incluidos en esta Tesis Doctoral han sido subvencionados, en parte, por las siguientes becas:

- Beca Unimetro 2000 para Soporte de Investigación, Universidad Metropolitana, Barranquilla, Colombia, 2000.
- Beca del Ministerio de Educación Cultura y Deporte de España, para Movilización de Científicos Extranjeros. N°72.129.052, 2000-2001.
- Beca de la Unión Europea, *European Network for Ageing muscle and Associated Diseases*. N° de contrato: QLK6-2000-00417PENAM, 2002-2003.
- Beca de la Unión Europea, *European Network for Investigating the Global Mechanisms of Muscle* (ENIGMA). N° de contrato: QLK6-CT-2002-02285, 2003-2004.
- Red RESPIRA, Título del proyecto: “Bases moleculares y fisiológicas de las enfermedades respiratorias. Implicaciones diagnósticas y terapéuticas. Expediente N° C03/011, 2004-2005.
- Beca para la investigación en músculo de la *Fundació Catalana de Pneumologia* (FUCAP), 2005.



## NOTA PRELIMINAR

---

Los resultados preliminares de los trabajos incluidos en esta Tesis Doctoral han sido presentados previamente en los siguientes congresos:

### **CONGRESOS INTERNACIONALES**

• C. Casadevall, **C. Coronell**, A. Ramirez-Sarmiento, J. Martinez-Llorens, E. Barreiro, M. Orozco-Levi, J. Gea. Upregulation of proinflammatory cytokine genes in the external intercostal muscle of COPD patients. *Eur Respir J* 2005; 26: Suppl. 49, 362s. (*European Respiratory Society Annual Congress, Copenhagen 2005*).

• E. Barreiro, B. de la Puente, **C. Coronell**, M. Polkey, A. M. Schols, J. Gea. Description of the cytokine profile using antibody arrays of peripheral muscles in severe COPD patients. *Eur Respir J* 2005; 26: Suppl. 49, 363s. (*European Respiratory Society Annual Congress, Copenhagen 2005*).

• **C. Coronell**, A. Ramirez-Sarmiento, G. Ercilla, O.P. Clavijo, J. Gea, E.J. Yunis, M. Orozco-Levi. Muscle Dysfunction in COPD Patients Associates with HLA System: Protective Role of DQB1 Alleles. Proc Am Thorac Soc 2005;2:A529. (*American Thoracic Society International Conference, San Diego 2005*).

• M. Orozco-Levi, **C. Coronell**, A. Ramirez-Sarmiento, G. Ercilla, O. Clavijo, E. Yunis, J. Gea. Muscle dysfunction in COPD patients associates with HLA system: risk and protective genotypes. *Eur Respir J* 2005; 26: Suppl. 49, 363s. (*European Respiratory Society Annual Congress, Copenhagen 2005*).

• M. Orozco-Levi, B. Abeijón, **C. Coronell**, A. Ramirez-Sarmiento, J. M. Broquetas, V. Curull. Expression of MIC-A in bronchial epithelium associates with cigarette smoking: a sign of induced autoimmune mechanisms? *Eur Respir J* 2005; 26: Suppl. 49, 714s. (*European Respiratory Society Annual Congress, Copenhagen 2005*).

• M. Orozco-Levi, **C. Coronell**, A. Ramirez-Sarmiento, J. Lloreta, J. Martinez-Llorens, J. M. Broquetas, J. Gea. Injury of the quadriceps muscle in COPD patients: role of the pulmonary disease and exertion. *Eur Respir J* 2004; 24: Suppl. 48, 217s. (*European Respiratory Society Annual Congress, Glasgow 2004*).

• **C. Coronell**, M. Orozco-Levi, J.B. Galdiz, A. Ramirez-Sarmiento, J.M. Broquetas, J. Gea. Early Onset of Peripheral Muscle Dysfunction in Patients with mild COPD. Am J Crit Care Med 2004;169 (suppl):A245. (*American Thoracic Society International Conference, Orlando 2004*).

• M. Orozco-Levi, A. Ramirez-Sarmiento, J. Lloreta, M.D. Ferrer, C. Coronell, J.M. Broquetas, J. Gea. Impairment of Subcellular Structure of the Quadriceps in Stable COPD Patients: An Electron Microscopy Study. Am J Crit Care Med 2004;169 (suppl):A904. (*American Thoracic Society International Conference, Orlando 2004*).

• C. Casadevall, C. Coronell, E. Barreiro, J.M. Corominas, M. Orozco-Levi, J. Gea. Increase in the Expression of the Gene Encoding TNF- $\alpha$  in the Human External Intercostal Muscle Following Inspiratory Loading. *Am J Crit Care Med* 2004;169 (suppl):A243. (*American Thoracic Society International Conference, Orlando 2004*).

• C. Casadevall, C. Coronell, A. Ramirez, E. Barreiro, M. Orozco-Levi, J. Gea. Local Expression of the Gene Encoding TNF-Alpha in the External Intercostal and Quadriceps Muscles of Severe COPD Patients. *Am J Crit Care Med* 2003;167 (suppl):A29. (*American Thoracic Society International Conference, Seattle 2003*).

• C. Coronell, M. Martinez-Llorens, A. Ramirez-Sarmiento, M. Orozco-Levi, E. Barreiro, J. Gea. Cytokine Expression at the External Intercostal of Healthy Human Beings. Effects of Ageing, Gender and an Exhaustive Specific Exercise. *Am J Crit Care Med* 2003;167 (suppl):A27. (*American Thoracic Society International Conference, Seattle 2003*).

• M. Orozco-Levi, M. Ferrer, C. Coronell, A. Ramirez-Sarmiento, J. Lloreta, E. Barreiro, J. M. Broquetas, J. Gea. Evidence of sarcomere disruption and myofibrillar degeneration in the quadriceps muscle of stable COPD patients. *Eur Respir J* 2003; 22: Suppl. 45, 552s. (*European Respiratory Society Annual Congress, Viena 2003*).

• C. Coronell, A. Ramirez-Sarmiento, Y. Nuñez, J. M. Broquetas, M. Orozco-Levi, J. Gea. Capillary density of the quadriceps in COPD patients: an structural determinant of muscle endurance?. *Eur Respir J* 2003; 22: Suppl. 45, 573s. (*European Respiratory Society Annual Congress, Viena 2003*).

• C. Coronell, M. Orozco-Levi, A. Ramirez-Sarmiento, J. Martinez-Llorens, J. M. Broquetas, J. Gea. Systemic inflammatory response associated with injury of the respiratory muscles in healthy subjects and COPD patients. *Eur Respir J* 2002; 20: Suppl. 38, 212s. (*European Respiratory Society Annual Congress, Estocolmo 2002*).

• C. Coronell, A. Ramirez-Sarmiento, J. Martinez-Llorens, E. Barreiro, M. Orozco-Levi, J. Gea. Cytokine expression in the external intercostal muscle of subjects with normal lung function *Eur Respir J* 2002; 20: Suppl. 38, 496s. (*European Respiratory Society Annual Congress, Estocolmo 2002*).

### **CONGRESOS NACIONALES:**

• C. Coronell, M. Orozco-Levi, A. Ramírez-Sarmiento, R. Méndez, J. Martínez-Llorens, J. Broquetas, J. Gea. Disfunción muscular periférica en pacientes con EPOC: ¿Una alteración infradiagnóstica?. *Arch Bronconeumol* 2002; 38 (supl 2):32-33. (XXXV Congreso Nacional de la SEPAR, **Maspalomas 2002**).

• C Coronell, M Orozco-Levi, A Ramírez-Sarmiento, J Martínez-Llorens, JM Broquetas, J Gea. Variables relacionadas con la disminución en la resistencia del músculo cuádriceps en pacientes con EPOC grave. *Llibre de Comunicacions* 2002:151. (VIII Symposium sobre EPOC. **Barcelona 2002**).

- **C Coronell**, R Méndez, A Ramírez-Sarmiento, MJ Masdeu, J Broquetas, J Gea, M Orozco-Levi. ¿Es relevante evaluar la resistencia de los músculos de las extremidades inferiores en pacientes con EPOC?. Arch Bronconeumol 2001; 37 (supl 1):3-4. (XXXIV Congreso nacional de la SEPAR, **A Coruña 2001**).



## DISTINCIONES

---

Las siguientes comunicaciones presentadas en congresos internacionales, han recibido menciones honoríficas, tal como se especifica a continuación:



Injury of the quadriceps muscle in COPD patients: role of the pulmonary disease and exertion, *ERS - COPD Travel Grant, Glasgow 2004.*



Muscle Dysfunction in COPD Patients Associates with HLA System: Protective Role of DQ $\beta$ 1 Alleles, *ATS Travel Grant, San Diego 2005.*





## Capítulo 1

# LA ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA

### DEFINICIÓN

El grupo de trabajo de la *Estrategia Global para Diagnóstico, Tratamiento y Prevención de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica* define la EPOC como “un proceso nosológico que se caracteriza por una limitación del flujo aéreo, que no es completamente reversible. La limitación del flujo aéreo es, por lo general, progresiva y se asocia con una respuesta inflamatoria pulmonar anormal a partículas o gases nocivos” (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease.; 2005). Esta definición implica que, para el diagnóstico de la EPOC, es indispensable la realización de pruebas funcionales respiratorias que demuestren esa obstrucción al flujo aéreo. Además, incluye un concepto dual por cuanto hace referencia simultánea a un conjunto de características clínicas (bronquitis crónica) con otras anatomopatológicas (enfisema pulmonar).

Los criterios clínicos de bronquitis crónica incluyen la presencia de tos y expectoración durante tres o más meses al año. El enfisema, por su parte, implica el aumento de los espacios aéreos periféricos (distales a los bronquiolos terminales) con destrucción de las paredes alveolares y sin presencia de fibrosis (American Thoracic Society.; 1995). La definición operativa de la EPOC se basa en el concepto de obstrucción al flujo aéreo, que se evidencia en la espirometría forzada, expresado como la reducción del cociente entre el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV<sub>1</sub>) y la capacidad vital forzada (FVC). La gravedad de la obstrucción se categoriza según el grado de disminución del FEV<sub>1</sub> porcentual. Los pun-

tos de corte para la definición de enfermedad y su gravedad varían ligeramente según las sociedades científicas autoras de los diversos consensos (American Thoracic Society/European Respiratory Society.; 2004; Barbera, J.A. *et al.*; 2001; Siafakas, N.M. *et al.*; 1995; The COPD Guidelines Group of the Standards of Care Committee of the BTS.; 1997).

### CLASIFICACIÓN DE LA GRAVEDAD

La clasificación en función de la gravedad de la EPOC se realiza según el FEV<sub>1</sub> (medido como porcentaje del valor de referencia según grupo étnico, género, edad, peso, talla) evaluado en fase de estabilidad clínica. Esta clasificación difiere ligeramente según las sociedades científicas autoras de los consensos (American Thoracic Society/European Respiratory Society.; 2004; Barbera, J.A. *et al.*; 2001; Celli, B.R. *et al.*; 2004; Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD).; 2005; Siafakas, N.M. *et al.*; 1995). En la presente Tesis Doctoral se ha utilizado la clasificación del último consenso entre la *American Thoracic Society* (ATS) y *European Respiratory Society* (ERS) del año 2004 (Celli, B.R. *et al.*; 2004), (ver tabla 1).

**TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE LA GRAVEDAD DE LA EPOC**

GRAVEDAD DE EPOC	%FEV <sub>1</sub> /FVC	FEV <sub>1</sub> (% VALOR DE REF.)
En Riesgo	> 70	> 80%
Leve	< 70	> 80%
Moderado	< 70	51-80%
Grave	< 70	30-50%
Muy Grave	< 70	< 30%

## ASPECTOS HISTÓRICOS

### Generalidades

La EPOC es una enfermedad altamente asociada al consumo de tabaco (ver figura 1) y a la exposición prolongada a partículas o agentes nocivos (The COPD Guidelines Group of the Standards of Care Committee of the BTS.; 1997). Estas dos condiciones tienen un largo recorrido histórico y se dan muy espaciadas en el transcurrir de la humanidad.



Figura 1. Planta de tabaco.

### El hábito de fumar

Al hablar de los orígenes del consumo de tabaco debemos centrarnos en la cultura Maya que extendió su consumo desde el año 2000

A.C. hasta el 987 D.C. (Pascual, F. *et al.*; 2004), y abarcó las regiones de Chiapas, Campeche, Yucatán, Guatemala y Honduras. Los Mayas eran excelentes marinos, y comerciaban por todo el Golfo de México, incluso por las islas del Caribe, entre otros productos llevaban cacao, henequén y tabaco, el cual fumaban (Martínez Llamas, A.; 1982; Martínez Llamas, A.; 1989). Debido a este comercio, todas estas islas tienen en común el tabaco de México, denominado por los Mayas como “CIKAR” (que en maya significa FUMAR).

Como consecuencia del comercio de los Mayas con los Olmecas, el tabaco fue difundido a todo el Norte de América hasta Canadá. Los estudios arqueológicos de tallas y grabados demuestran cómo este pueblo centroamericano dio al fumar un carácter religioso y ceremonial (ver figura 2). El tabaco fue muy utilizado por los Mayas durante los ritos y ceremonias mágicas (tanto los 4 bacabs como el dios Ah Puch eran fumadores empedernidos) así como en terapéutica (La Medicina Maya.; 2005). Algunos pueblos de la América precolumbina no sólo emplearon el tabaco con fines rituales, sino que llegaron a utilizarlo con fines curativos. Y es que los nativos Mayas estaban convencidos de que la enfermedad era producida por un mal espíritu que se apoderaba o habitaba en el enfermo, y sólo podía ser expulsado de él mediante el humo del tabaco. También lo usaron simplemente por placer o como estimulante en situaciones adversas. Sin embargo, también aparece en los escasos libros o códices mayas escrito el término *yumulkabil* (también *zemil*) que designa a la enfermedad pulmonar crónica, tal vez más padecida por los chamanes que eran fumadores crónicos (La Medicina Maya.; 2005). De estas situaciones mágico-religiosas hace mención Antonio Solís que, en su libro la Conquista de México, relata la siguiente experiencia de consumo de tabaco en una de las fiestas de Montezuma: “*el humo del tabaco, suavizado con liquidámbar, vicio que llamaban medicina, y en ellos tuvo algo de superstición, por ser el zumo de esta yerba uno de los ingre-*



Figura 2. Grabados y pinturas Mayas, demostrando el uso del tabaco.

*dientes con que se dementaban y enfurecían los sacerdotes siempre que necesitaban perder el entendimiento para entender al demonio” (Martinez Llamas, A.; 1982).*

En época precolombina, hacia finales del siglo XII, los Aztecas invadieron el territorio Maya y asimilaron la costumbre de fumar tabaco, aunque dieron al fumar un carácter más social que religioso. Los Aztecas conservaron la costumbre hasta la llegada de los españoles a principios del S. XVI (Brosse, J.; 1990).

Para los habitantes del Viejo Mundo, el tabaco fue descubierto por dos marinos españoles mientras exploraban la isla de Cuba por orden del mismo Colón. El hallazgo fue en las playas de San Salvador donde fueron recibidos por nativos que llevaban frutas, jabalinas y “*hojas secas que desprendían una peculiar fragancia*”. Rodrigo de Jerez, uno de los marinos que acompañó al Almirante Colón en su primer viaje, relató de esta forma el hallazgo del tabaco: “*Hallaron los dos cristianos por el camino mucha gente que atravesaba a sus pueblos,*

*mugeres y hombres, con un tizón en la mano, (y) yervas para tomar sus sabumerios que acostumbra van. No hallaron población por el camino de más de cinco casas, y todos les hazían el mismo acatamiento”*

La palabra tabaco parece ser que proviene de la Isla de La Española pues este era el nombre que utilizaban los indígenas para denominar al instrumento utilizado para hacerlo servir y para la misma acción de tomarlo; así, los españoles adoptaron este vocablo para designar esta nueva planta. Crónicas como las de Gonzalo Fernández Oviedo y Fray Francisco De las Casas, entre otros, contribuyeron a extender su conocimiento y uso entre los europeos indios y continentales: *“Tomaban el aliento y humo para sí una y dos y tres y mas vezes hasta que quedaban sin sentido gran espacio o adormidos de un grande y muy pesado sueño (...) E aquel instrumento con que toman el humo llaman los Indios Tabaco, y no a la yerva o sueño que les toma. Pero esta yerva tenían los indios por cosa muy preciada y la crían en las haciendas y heredamientos de sus amos (...) porque dicen que cuando dejan de trabajar y toman el tabaco, se les quita el cansancio. Sé que algunos cristianos lo usan, en especial algunos que están tocados por el mal de las bubas, porque dicen los tales que aquel tiempo que están así transportados no sienten los dolores de su enfermedad”* (Edición Digital “Desde la semilla al humo” El tabaco negro en Pinar del Rio.; 2005).

En la Historia Natural y General de las Indias de Gonzalo Fernández de Oviedo, publicada en 1553, se decía: *“Usaban los indios de esta isla, entre otros sus vicios, uno muy malo, que es tomar unas abumadas, que ellos llaman tabaco, para salir del sentido”*. El mismo Gonzalo Fernández de Oviedo dice que en las Indias Occidentales el tabaco se llamaba, *“cohibá o cojibá, cohob y cojioba, y era purgante muy empleado por los nativos en el Nuevo Mundo. Fumaban puros, es decir, los rollos hechos con las hojas secas, y los tomaban en abumadas”* (García, R.; 1881). Los primeros en utilizarlo fueron los expedicionarios y los trabajadores,

y luego pasó a clases más privilegiadas por la multiplicidad de usos otorgados por los nativos a la planta.

Fue el mismo Rodrigo de Jerez quien en 1510 introduciría el hábito de fumar en España y en muchos otros países. Este hecho le costó muchos años de cárcel, y fue condenado por la Inquisición, quien sólo otorgaba poder de echar humo por la boca al diablo. Francisco Hernández de Toledo introdujo la semilla en España. El médico de Sevilla, Nicolás Monardes (1508-1588), llevó a cabo la primera aclimatación europea de la planta, bajo la creencia de que era una auténtica panacea que servía para curar hasta un total de 65 enfermedades. De España el tabaco pasó a Portugal y, posteriormente, en 1561 el diplomático Jean Nicot lo introdujo en Francia. A este embajador de la corte lusitana se le debe el nombre genérico de la planta (*Nicotiana tabacum*). Se creía útil el tabaco para curar eczemas, cefaleas, ceguera, dolor de muelas, tos e incluso asma crónica. En 1585 lo llevaron a Inglaterra el navegante Sir Francis Drake y el explorador inglés Sir Walter Raleigh, quien inició en la corte isabelina la costumbre de fumar el tabaco en pipa (Martínez Llamas, A.; 1982). El nuevo producto se difundió rápidamente por Europa y Rusia, y en el siglo XVII llegó a China, Japón y a la costa occidental de África. El hábito se puso poco a poco de moda y en el siglo XVI fumar, primero como placer y después como medicamento, había sido adquirido por todo tipo de clases sociales: La pipa entre las más elevadas y el rollo de hojas, como precursor del cigarro puro, entre las más populares.

Al principio fueron los frailes en las huertas cerradas de sus conventos los más entusiasmados plantadores de tabaco, quienes lo utilizaban con fines ornamentales y medicinales. Así, el hecho de que el tabaco se cultivara preferentemente en estos lugares cerrados llevó más tarde a dar el nombre de estancos a los comercios donde debía venderse. En parte, la fama de medicamento le vino por la experiencia que tuvo la reina Catalina de Médicis (1560), quien sufría fuertes jaquecas. Ésta hizo caso al ilustre emba-



hechos con hojas producidas en las colonias españolas de ultramar. En el año 1717, un real Decreto de la Corona de España dio lugar a la fundación de la primera fábrica de tabaco en Cuba, la Real Factoría de La Habana, y se implantó así un régimen de monopolio para la naciente industria cubana.

La América colonial anglófona se convirtió en el primer productor mundial de tabaco. El cultivo se inició en el asentamiento de Jamestown, donde ya en 1615 la planta crecía en jardines, campos y hasta en las calles. En poco tiempo se convirtió el tabaco en el producto agrícola básico y principal medio de subsistencia de la colonia. En 1776, el cultivo se extendió hacia Carolina del Norte y llegó por el oeste hasta Missouri. Hacia 1864, un agricultor de Ohio obtuvo por casualidad una cepa deficiente en clorofila que recibió el nombre de *burley blanco*, y acabó por convertirse en el ingrediente principal de las mezclas de picadura americana para la fabricación de cigarrillos.

Según García Ramón se tenía ya en cuenta el daño del tabaco pero sólo en los siguientes casos: *“Ya lo hemos dicho, y volvemos a repetirlo: el tabaco es peligroso cuando se abusa de él ó bien por una predisposición individual. Existe empero un caso en que su acción nociva es positiva e incontestable, y es durante la infancia y primera juventud. De los diez a los quince años, debe el hombre abstenerse del tabaco, pues en este periodo de la vida ejerce una influencia perjudicial en los órganos cerebrales”* (Martínez Llamas, A.; 1982).

En 1884 James A. Bonsasck patentó la primera máquina de hacer cigarrillos, capaz de hacer hasta 120.000 unidades al día. Mientras en España y en sus colonias se prefería el tabaco enrollado en forma de cigarro, y después el cigarrillo, en el resto de Europa prevaleció la pipa. En el siglo XVII se comenzó a aspirar *rapé* por la nariz (polvo de tabaco, cuyo nombre le viene del instrumento utilizado para rallarlo, [ver figura 4]); la gran moda del *rapé* corresponde al siglo XVIII y se empezó a fabri-

car en 1786 en la Real Fábrica de Tabacos de Sevilla; este tipo de consumo fue un signo de distinción social. Había rapé perfumado (con agua de rosas) y de distintos colores.

El tabaco para masticar (que se preparaba en “cuerdas” mezclando regaliz y otros productos) fue siempre patrimonio de la gente de mar, por la obvia dificultad de fumar durante la maniobra de las velas.

A principios del siglo XIX se empezaron a fabricar cigarrillos en Francia e Inglaterra, y se vendían en ruedas o unidades sueltas. Incluso existían consejos para fumar: *“El ciga-*



Figura 4. Individuo aspirando rapé.

*rrillo debe fumarse aspirando poco humo de una vez y con intervalos de un minuto entre las fumadas”.* *“Digamos que si el tabaco es un remate sabroso a la comida, no debe fumarse sino un cuarto de hora después del último pla-*

to, es decir, cuando se sirve el café, con tanto más motivo cuanto que el café es un correctivo tan enérgico como delicioso del tabaco” (García, R.; 1881).

Los cigarros puros seguían consumiéndose en gran cantidad, a mediados del siglo XIX. Cuba exportaba alrededor de 250 millones de puros al año y en Francia en 1874 se llegaron a fumar 742 millones de cigarros, lo que equivalía a 20 cigarros por persona en un año, (entre 20 y 30 cigarros al año sería la cantidad adecuada según los tratados tabáquicos de la época y la norma para un *tabaquista*, y uno al día si se trata de cigarro de papel o pipa), “después del almuerzo o comida que es cuando mayor solaz procura”, consejo que por otro lado no seguía ningún fumador, cuyo consumo medio era de un cigarrillo cada media hora o incluso más.

### Enfermedades respiratorias debidas al tabaco

Los efectos negativos, por otro lado, se hacían notar. Boinseregard, en 1701, advertía: “Los jóvenes que toman demasiado tabaco tienen las manos temblorosas, inseguras, les bailan los pies y se marchitan sus partes nobles”. En 1761 se establece una relación del cáncer de nariz con el consumo de rapé, y en 1795 la aparición de cáncer de labio en fumadores de pipa.

Debido al consumo masivo y frecuente del tabaco se empiezan a dar síntomas respiratorios en este tipo de individuos, que se comienzan a diagnosticar debido a las aportaciones de la escuela francesa de Neumología y su creciente interés por relacionar los hallazgos clínicos con las descripciones patológicas. También contribuye la incorporación a la práctica médica de la auscultación cardíaca y respiratoria, a partir del desarrollo del estetoscopio (ver figura 5), (Laennec, R.T.H.; 1819). Laennec introdujo el uso del término “obstrucción bronquial” en este tipo de enfermedades respiratorias.



Figura 5. Estetoscopio inventado por René-Théophile Laënnec.

La definición del concepto de “enfisema”, de una forma muy similar a la que aún seguimos utilizando, la debemos a René Laënnec y fue introducida en la práctica médica a principios del Siglo XIX. En el mismo período, el médico inglés Charles Badham (Badham, C.; 1814) utilizó por primera vez el término “bronquitis” en la práctica clínica. La introducción del espirómetro en la práctica médica a partir de los trabajos de Hutchinson (Hutchinson, J.; 1846), (ver figura 6) y las aportaciones Posteriores de Tiffeneau y Pinelli (Tiffeneau, R. *et al.*; 1948) permitieron objetivar la obstrucción bronquial de una forma reproducible y práctica, de manera muy similar a como sigue realizándose actualmente.

Un paso de gigante para definir de una forma práctica y reproducible estas enfermedades respiratorias se dio en 1958, con motivo del Symposium internacional auspiciado por Ciba y cuyas conclusiones fueron publicadas en las mejores revistas de la especialidad (Ciba Foundation Guest Symposium.; 1959) y posteriormente aceptadas por la propia Sociedad Americana del Tórax (American Thoracic Society.; 1962). Durante muchos años se han utilizado estas definiciones en la enseñanza de la Neumología y en la práctica clínica, y se ha resaltado como puntos más importantes las diferencias entre los conceptos de “bronquitis crónica”, “asma” y “enfisema” (Casan, P.; 2004).



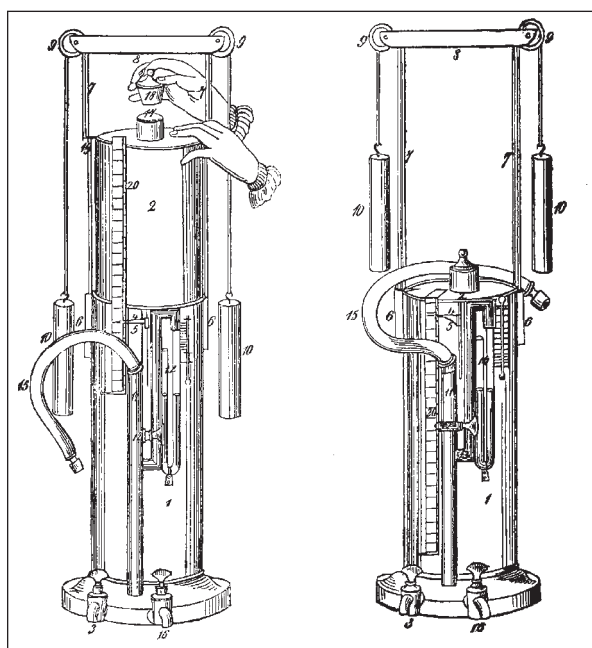


Figura 6. Espirómetro inventado por John Hutchinsonson.

La **bronquitis crónica** se definía entonces como “la presencia de tos y expectoración, durante al menos tres meses al año y por un mínimo de dos años consecutivos, en un paciente en quien se hubieran descartado otras causas productoras como la tuberculosis, el carcinoma de pulmón o la insuficiencia cardíaca”. Al tratarse únicamente de objetivar la presencia de signos y síntomas (tos y expectoración) la definición resultaba muy aplicable en la práctica médica y con ello se consiguió la popularización de este concepto (Casan, P.; 2005). El paso inmediato se dio cuando pudo relacionarse de una forma clara y directa el papel del tabaco con la etiología de la bronquitis crónica (U.S.General Surgeon.; 1984) y el reconocimiento posterior de otros factores responsables permitió profundizar en su patogenia y en la complejidad de este proceso (Higgins, M.; 1991).

En el mismo período de tiempo, el **enfisema** se definía en términos morfológicos. Esto hacía ciertamente difícil, y a menudo impracticable, utilizar los conceptos derivados de su

definición en la práctica clínica diaria (Ciba Foundation Guest Symposium.; 1959). Por otra parte, los hallazgos de prestigiosos especialistas como Snider, Thurlbeck, Reid, Burrows y Petty permitieron avanzar en la clasificación y en el conocimiento de estas variedades de patología bronquial y pulmonar (Burrows, B.; 1990; Petty, T.L. *et al.*; 1987; Snider, G.L. *et al.*; 1985).

Aunque múltiples estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto la relación entre tabaco y EPOC, es obligatorio citar el clásico trabajo de Fletcher (Fletcher, C.M. *et al.*; 1976) quien demostró el diferente comportamiento que ante el consumo de tabaco experimentaban distintos grupos del estudio (ver figura 7). Así, mientras un grupo de personas no modificaban la fisiológica disminución que su FEV<sub>1</sub> experimentaba con el paso del tiempo, otro grupo de fumadores aumentaba negativamente, y de manera significativa, el descenso del FEV<sub>1</sub>, correlacionándose este descenso con el número de cigarrillos consumidos. Así pues, se estableció el concepto de pacientes susceptibles al humo del tabaco (un 15 por ciento de las personas), aunque se desconoce cuál es la causa que lo determina y, lo que es más importante, se estableció sin género de dudas la clara relación entre tabaquismo y EPOC.

La definición de EPOC ha experimentado diferentes aproximaciones clínicas y epidemiológicas en los últimos años. Las más recientes fueron propuestas de forma simultánea por las respectivas Sociedades Neumológicas Europea y Americana (American Thoracic Society.; 1995; Siafakas, N.M. *et al.*; 1995) y permanecen aún en plena vigencia. La propia Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica elaboró una propuesta consensuada (Montemayor, T. *et al.*; 1996) y casi, simultáneamente, la Sociedad Torácica Británica redactó también sus propias definiciones (The COPD Guidelines Group of the Standards of Care Committee of the BTS.; 1997). Actualmente hay una aproximación al estudio de la inflamación y a sus marcadores en las vías aéreas de los pacientes diagnosticados de EPOC en sus diferentes variantes (Global Initiative

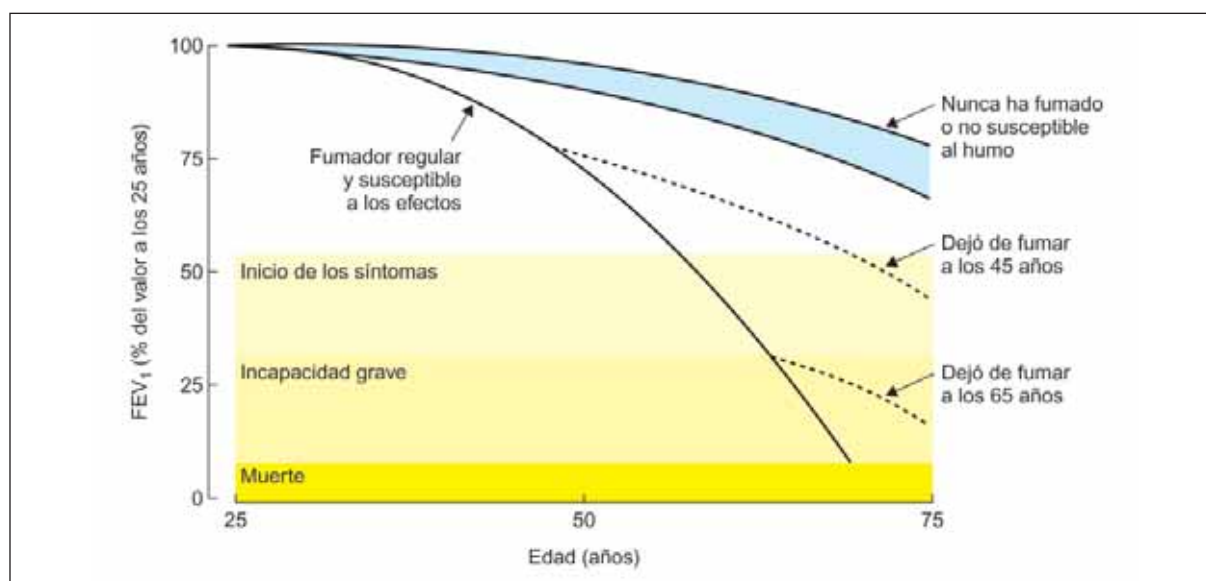


Figura 7. Diagrama de Fletcher, modificado de Fletcher, C.M.; 1976.

for Chronic Obstructive Lung Disease.; 2005; O'Byrne, P.M. *et al.*; 1999). Sin dejar de pensar en términos de “limitación al flujo aéreo” y en su “mayor o menor respuesta frente a la acción de los broncodilatadores” nos habituamos progresivamente a valorar el papel de los neutrófilos y de los eosinófilos en el territorio bronquial y a las consecuencias de la acción terapéutica de los corticoides y otros antiinflamatorios.

## EPIDEMIOLOGÍA

### Factores de riesgo

Como se ha visto, el humo del tabaco se considera el principal factor de riesgo para la aparición y desarrollo de la enfermedad. En la década de los años 70 se demostró que un hombre no-fumador pierde una media de 25 ml de FEV<sub>1</sub> por año (Fletcher, C.M. *et al.*; 1976) y que esta pérdida es más acelerada en los fumadores, así como existe un grupo de fumadores “susceptibles”, en los cuales la pérdida de función pulmonar es todavía más acelerada (hasta 100 ml de FEV<sub>1</sub>/año). Este grupo de fumadores es el que desarrolla la enfermedad.

Además, hay un patrón de agregación familiar en la EPOC (Silverman, E.K. *et al.*; 1998). Estos dos conceptos implican una susceptibilidad determinada genéticamente y que probablemente tiene interacciones complejas para el desarrollo de la enfermedad. En el altiplano Cundiboyacense, de la región andina Colombiana, es frecuente también observar la presencia de EPOC asociada a la exposición al humo de leña (biomasa), fundamentalmente en mujeres expuestas en su domicilio mientras cocinan alimentos (Dennis, R.J. *et al.*; 1996); También en España se ha evidenciado recientemente la presencia de EPOC asociada a la exposición a humo de leña (Orozco-Levi, M. *et al.*; 2006a). Otro factor de riesgo identificado ha sido la presencia de hiperreactividad bronquial, dado que el deterioro funcional (caída del FEV<sub>1</sub>) es mayor al esperado independientemente al efecto del tabaco; es la llamada “teoría holandesa” de origen de la EPOC (Rijcken, B. *et al.*; 1995). Otros factores de riesgo están asociados a la exposición laboral a polvos minerales (p.e. trabajadores en minas de carbón y oro, en fundiciones, etc.), u orgánicos (vegetales o animales) (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease.; 2005). La contaminación ambiental ha

sido definida también como un factor de riesgo para el desarrollo de EPOC, aunque existen dificultades metodológicas para precisar la exposición (Sunyer, J.; 2001). Finalmente, las infecciones respiratorias en la infancia se han relacionado de forma prospectiva con un menor FEV<sub>1</sub> durante el desarrollo (Gold, D.R. *et al.*; 1989) aunque no existen estudios con seguimiento hasta la edad adulta para precisar su relación inequívoca con la EPOC.

### Prevalencia y morbi-mortalidad

La mayoría de la información disponible sobre la prevalencia, morbilidad y mortalidad de la EPOC proviene de los países desarrollados. Pero todavía en estos países la precisión de los datos epidemiológicos acerca de la EPOC es difícil de conseguir. En los datos de prevalencia y morbilidad están probablemente muy infraestimadas, ya que la EPOC no se diagnostica generalmente sino hasta que es clínicamente evidente y por tanto moderadamente avanzada. Las definiciones imprecisas y variables de la EPOC han hecho difícil tam-

bién cuantificar la morbilidad y mortalidad de esta enfermedad tanto en países desarrollados (Pride, N.B. *et al.*; 1989) como en vías de desarrollo. Los datos recogidos también infraestiman la EPOC como causa de muerte, porque la enfermedad probablemente es más citada como contribuidora que como causa principal del fallecimiento, o puede incluso no ser citada (Mannino, D.M. *et al.*; 1997).

Según el Estudio de la Carga Global de la Enfermedad (GBD, sigla en inglés) conducido bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y del Banco Mundial, la prevalencia mundial de la EPOC en 2002 fue estimada en 11,6/1000 en hombres y 8,77/1000 en mujeres. Sin embargo, estas estimaciones incluyen todas las edades y la prevalencia verdadera de la EPOC es más alta en adultos mayores. La prevalencia de la EPOC es también más alta en los países donde hay predominio de consumo de tabaco, o sigue siendo muy común, mientras que la prevalencia es más baja en los países donde es menos común fumar, o el consumo de tabaco por individuo es bajo (WHO.; 2005) (ver figura 8).

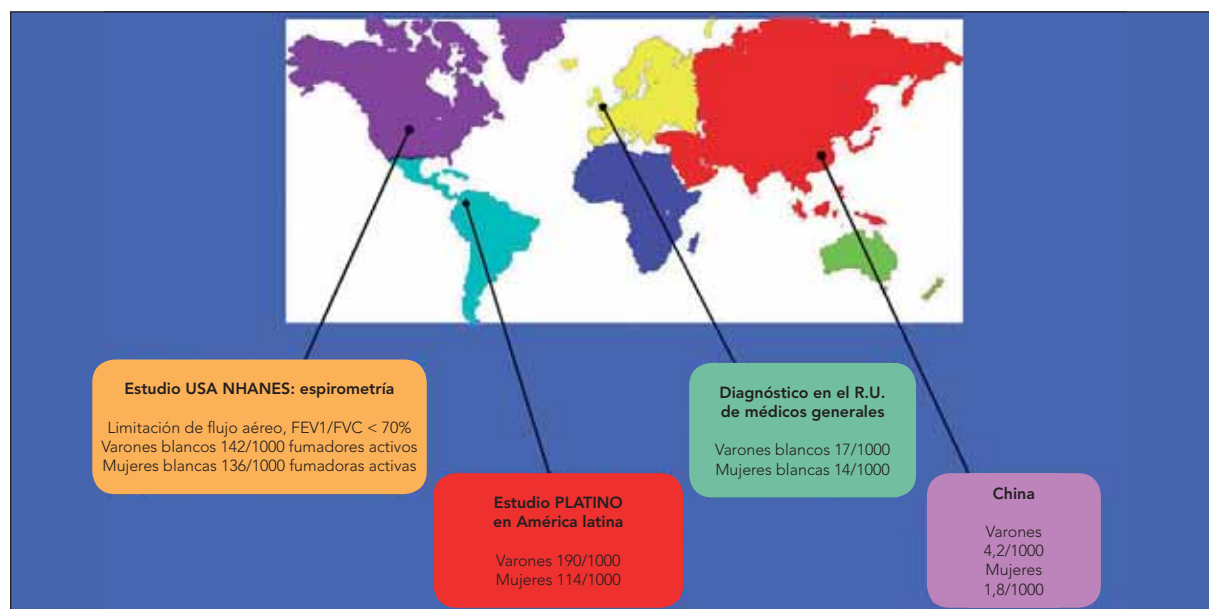


Figura 8. Prevalencia mundial de la EPOC, modificado de Hansel, T.T. et al; 2005; Menezes, A.M. et al.;2005.

Lo escasos datos disponibles indican que la morbilidad debido a la EPOC aumenta con la edad y es mayor en hombres que en mujeres. La EPOC es responsable de una parte significativa de visitas médicas, de consultas de urgencias y de hospitalizaciones. Las estimaciones del estudio GBD indican resultados de la EPOC en YLDs (sigla en inglés de años vividos con incapacidad) de 1,68 por cada 1000 habitantes, que representa 1,8% de todos los YLDs. Los datos separados por género son 1,93 y 1,42 por cada 1000 hombres o mujeres, respectivamente (WHO.; 2005).

La EPOC es actualmente la cuarta causa principal de muerte en el mundo y se pueden predecir aumentos en la prevalencia y mortalidad de la enfermedad en las décadas venideras. En los Estados Unidos de América los índices de mortalidad de la EPOC son muy bajos entre los pacientes menores de 45 años, pero después aumentan con la edad; y la EPOC se convierte en la cuarta o quinta causa principal de muerte entre los mayores de 45 años. Globalmente, las estimaciones del estudio GBD de 2002 demostraron que la EPOC dio lugar a 2,75 millones de muertes que representaban el 4,8% del total. Separadas por género, representaban 1,41 y 1,34 millones de muertes en varones y en mujeres, respectivamente (WHO.; 2005).

La prevalencia de la EPOC en España ha sido estimada en un 9% de la población con edades comprendidas entre los 40 y los 69 años y ha aumentado en los últimos años (Izquierdo, J.L.; 2003). Se ha encontrado que la prevalencia de la EPOC es tres veces más alta en hombres (14,3%) que en mujeres (3,9%), con una variación considerable en la razón de prevalencia en las diferentes áreas del país (5-18%). Sin embargo, dado que el tabaquismo se ha incrementado en las mujeres, se asume que haya un aumento de la prevalencia de la EPOC en estas en los próximos años. De acuerdo al estudio IBERPOC, se ha estimado que en España hay 1,2 millones de personas afectadas por la EPOC, con edades comprendidas entre los 40 y los 70 años (Pena, V.S. *et al.*; 2000). Este

estudio también demostró que en un 78,2% de los casos no existía diagnóstico en el momento de la encuesta.

A nivel de Cataluña la prevalencia es similar (7%) a la general en España, y es también más frecuente en el género masculino (Jaen, A. *et al.*; 1999).

### Impacto socioeconómico

A pesar de las diversas campañas antitabaco, la morbilidad y la mortalidad por EPOC continúan incrementándose y la incidencia de fumadores jóvenes es cada vez mayor. Esto se ve agravado teniendo en cuenta que existe la percepción de un grado importante de infra-diagnóstico. Como ya se ha dicho, actualmente la EPOC es la cuarta causa mundial de muerte (Murray, C.J. *et al.*; 1996) y se estima que para el año 2020 será la tercera, con más de 4,5 millones de defunciones anuales. La EPOC representa, además, una de las principales causas de morbilidad (consultas, asistencia a urgencias, hospitalizaciones) (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease.; 2005) por lo que su impacto económico y social es muy elevado.

La EPOC tiene además una historia natural de años de evolución e implica altos costes directos por morbilidad (fármacos utilizados, demanda de asistencia, ingresos hospitalarios) e indirectos (años perdidos por incapacidad y muerte) (ver tabla 2 y figura 9). Específicamente, la EPOC representa a nivel mundial (estadísticas del año 1990) la duodécima causa de DALY's (*Disability Adjusted Life Year* o suma de años perdidos debido a mortalidad prematura y años vividos en discapacidad, ajustados por gravedad). Se estima que para el año 2020 la EPOC será la quinta causa mundial de pérdidas de DALY's, por detrás únicamente de la enfermedad cardíaca isquémica, la depresión mayor, los accidentes de tráfico y la enfermedad cerebro-vascular (Murray, C.J.L. *et al.*; 1996).

**TABLA 2. COMPARACIÓN EN CUATRO PAÍSES DEL COSTE DIRECTO E INDIRECTO DE LA EPOC**

PAÍS (REF.)	AÑO	COSTE DIRECTO (\$ MILLONES)	COSTE INDIRECTO (\$ MILLONES)	TOTAL (\$ MILLONES)	PER CAPITA (\$ MILLONES)
Reino Unido (National Health Service Executive.; 1996)	1996	778	3.312	4.090	65
Holanda (Rutten-van Molken, M.P. <i>et al.</i> ; 1999)	1993	256	ND	ND	ND
Suecia (Jacobson, L. <i>et al.</i> ; 2000)	1991	179	281	460	60
EEUU(Chen, J.C. <i>et al.</i> ; 1999)	1993	14.700	9.200	23.900	87

Modificado de Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease.; 2005.

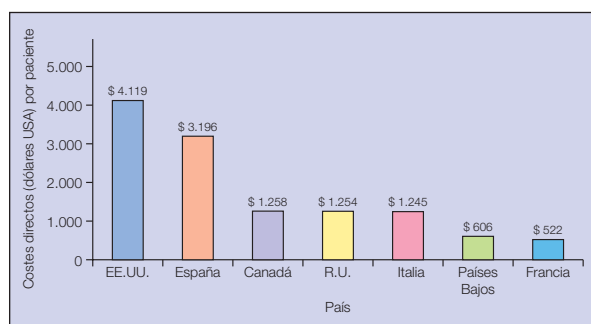


Figura 9. Impacto económico de la EPOC, modificado de Wouters, E.F.; 2003.

Los costes indirectos generados por la EPOC reflejan las consecuencias económicas de la incapacidad, pérdida de trabajo, mortalidad prematura y costes a las entidades prestadoras de salud, así como los costes familiares resultantes de la enfermedad (Sullivan, S.D. *et al.*; 2000). Un estudio finlandés ha estimado que el coste indirecto debido a la pérdida de capacidad laboral, restricciones en las actividades de la vida diaria y efectos socio-psicosociales es de 0,59 billones de euros (Kanervisto, M. *et al.*; 2003).

La morbilidad y mortalidad debidas a la EPOC implican una carga substancial en el sistema socio-sanitario Español y para la sociedad en su totalidad. Basándose en las estadísticas estatales y en los datos epidemiológicos, un análisis económico de la EPOC en España ha estimado que el coste total de esta enfermedad es de 841,42 millones de euros (equivalente al 2% del presupuesto anual del Ministerio de Salud y al 0,25% del Producto Interno Bruto) (Krief B.; 1996). Mientras que el coste directo por paciente y año alcanza los 1.876 euros de promedio, le corresponde a hospitalización el 43,8%, los medicamentos el 40,8% y las visitas y pruebas diagnósticas el 15,4% del total de los costes por paciente (Miravitlles, M. *et al.*; 2003).

En Cataluña la EPOC tiene una tasa de mortalidad de 44,69 por cada 100.000 habitantes (estadísticas del 2000), representa la tercera causa de altas hospitalarias (10,1% del total), y se considera la EPOC como una de las enfermedades que más crecen, ya que se ha observado un incremento global del 12,1% entre los años 1997 y 2000 (Pla de Salut de Catalunya.; 2003).

## Capítulo 2

# LOS MÚSCULOS EN INDIVIDUOS SANOS

### GENERALIDADES

La **URMAR**, de la UPF-IMIM-Hospital del Mar, tiene más de 15 años de experiencia en el estudio de músculos respiratorios y periféricos, tanto en pacientes con EPOC como en controles sanos. Antes de entrar en materia, se desarrollarán los capítulos siguientes donde se exponen la histología, anatomía y fisiología de los músculos esqueléticos o estriados, tanto respiratorios como periféricos.

Esta tesis sólo trata de los músculos esqueléticos, que son el mayor componente tisular del cuerpo humano, y que corresponde al 40% del peso total de un individuo normal (Testut, L. *et al.*; 1969a); se denominan también músculos voluntarios por que dependen de la estimulación nerviosa voluntaria para que se contraigan; de dichas contracciones, el músculo esquelético permite los movimientos de los distintos huesos para desempeñar actividades cotidianas de la vida de relación, lo que comprende todas las acciones que involucran movimiento, desde poder alimentarnos hasta deambular.

### HISTOLOGÍA DE LOS MÚSCULOS ESQUELÉTICOS

Cada músculo está envuelto de forma individual por una cubierta de tejido conjuntivo llamada **epimisio**. Esta cubierta presenta prolongaciones que penetran hacia el interior del mismo dando lugar al **perimisio** y a la división del músculo en fascículos de diverso tamaño. Finalmente, cada una de las fibras musculares está envuelta a su vez por una fina lámina de

tejido conjuntivo, el **endomisio** (Junqueira, L.C. *et al.*; 2005) (Ver Figura 10).

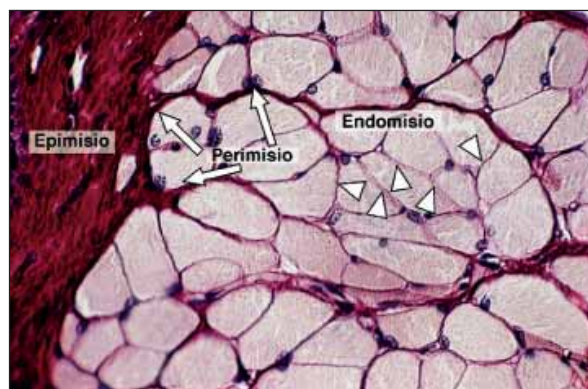


Figura 10. Microfotografía donde se muestran las envolturas conectivas de los músculos, modificado de Junqueira, L.C. *et al.*; 2005.

De forma individual, las fibras musculares son células sincitiales multinucleadas con los núcleos dispuestos por debajo de la membrana celular o **sarcolema**. En las secciones longitudinales vistas al microscopio óptico son características dos estructuras: las **miofibrillas**, de disposición longitudinal, y las **estriaciones**, de disposición perpendicular. Ambas son el resultado de la particular distribución de las proteínas contráctiles del músculo estriado (Junqueira, L.C. *et al.*; 2005).

La longitud de las fibras musculares en el adulto es variable, y pueden alcanzar los 50 cm en el músculo sartorio. Desde hace muchos años se conocía que los músculos estaban formados por fibras diferentes, y se hablaba de músculos rojos y músculos blancos

(Ranvier, L.; 1873). Actualmente se sabe que esta diferencia de color depende del tipo de fibra de la que el músculo está constituido. Todos los músculos esqueléticos humanos están conformados por tres tipos de fibras musculares: Tipo I, IIa y IIx, en función de la isoforma expresada en la cadena pesada de la miosina (MHC, sigla en inglés de Myosin Heavy Chain) (Brooke, M.H. *et al.*; 1969). Las fibras tipo I se caracterizan por tener gran capacidad para el metabolismo aeróbico, alta densidad capilar y mitocondrial, y tener tolerancia a contracciones repetidas durante períodos prolongados de tiempo. Es por lo anterior que se les define como “resistentes a la fatiga”. Las fibras tipo IIa presentan metabolismo aeróbico más rápido. Tienen menor densidad capilar y mitocondrial pero son igualmente resistentes a la fatiga. Las tipo IIx son fibras de glicólisis rápida, con fatigabilidad rápida, pero capaces de generar alta tensión. El mayor o menor predominio de determinado grupo de fibras en un músculo puede ser modificado (plasticidad molecular). Este cambio depende, básicamente, del tipo de trabajo al que sea sometido (condicionamiento modulado). Además de las fibras que contienen uno de los 3 tipos de isoformas, existe una pequeña proporción de fibras “híbridas”, es decir, las que coexpresan dos isoformas de miosinas (Andersen, J.L. *et al.*; 1994b; Klitgaard, H. *et al.*; 1990b; Klitgaard, H. *et al.*; 1990a; Larsson, L. *et al.*; 1997). Los datos de los anteriores estudios han revelado que la coexpresión de MHC IIa y MHC IIx son especialmente frecuentes, y representa entre un 10% al 15% del total de las fibras, mientras que las fibras que coexpresan MHC I y MHC IIa son menos frecuentes (Andersen, J.L. *et al.*; 1999).

Los diámetros transversales son asimismo variables. En el bíceps braquial, el tamaño de las fibras de tipo I es de unas 60  $\mu\text{m}$  en el hombre, y 57  $\mu\text{m}$  en la mujer, mientras que en las fibras de tipo II es del orden de las 70  $\mu\text{m}$  en el hombre y 50  $\mu\text{m}$  en la mujer. Esta diferencia de tamaños, mayor en las fibras de tipo II en el hombre y en las fibras de tipo I

en la mujer, no se observa hasta los quince años. En edades más tempranas, ambos tipos de fibras presentan diámetros similares en los dos géneros.

## La unidad contráctil muscular

Con **microscopía electrónica** puede observarse que las miofibrillas aparecen constituidas por filamentos perfectamente ordenados: unos gruesos, de 110 a 120 Å de diámetro, que se identifican como filamentos de **miosina**, que están formados por cadenas de polipéptidos (dos cadenas pesadas y cuatro livianas); y otros delgados, de unos 60 a 70 Å de diámetro que se identifican como filamentos de **actina**. Los filamentos de actina se disponen paralelamente y se anclan en unas estructuras transversales gruesas de 340 a 1300 Å de espesor, denominadas bandas Z (ver figura 11). Los filamentos de miosina se disponen centralmente, y alternan con los filamentos de actina. La proporción entre estos miofilamentos aparenta ser constante (1500 filamentos de miosina por 3000 filamentos de actina) (Guyton, A.C. *et al.*; 2000) y su organización es geométrica, una al lado de la otra, en sentido longitudinal. Los miofilamentos de actina están íntimamente organizados con las moléculas de tropomiosina y troponina. La actina se organiza conformacionalmente en forma de hélice sobre su eje longitudinal, similar a las moléculas de miosina, y sobre ella se enrollan las moléculas de tropomiosina. Por su parte, la troponina cuenta con tres subunidades (I, T, y C) y constituye el cuarto complejo molecular participante en la contracción y relajación musculares (Guyton, A.C. *et al.*; 2000).

Las zonas más mediales de los filamentos de miosina presentan uniones de refuerzo con una estructura reticular que en los cortes longitudinales aparece como bandas densas o bandas M. La estructura limitada por dos bandas Z se denomina **sarcómera** y constituye la unidad funcional contráctil del músculo estriado.

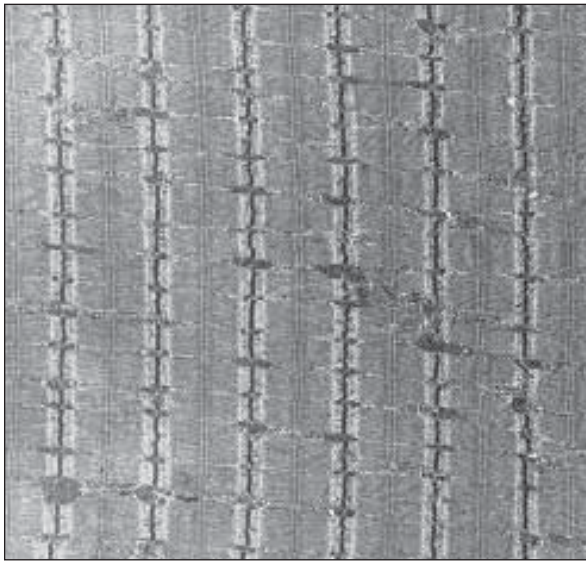


Figura 11. Aparato contráctil del músculo estriado, constituido por distintas unidades (sarcómeras) dispuestos longitudinalmente (Coronell, C. et al.; 2006).

En la figura 12 se representa la estructura de la sarcómera, la distribución y composición de las bandas, y el mecanismo de la contracción muscular por la interpenetración de los filamentos de actina y miosina, con el consiguiente acortamiento de la sarcómera. La disposición aditiva de sarcómeras longitudinalmente da lugar al aspecto de las miofibrillas obtenido con la **microscopía óptica**. La disposición en paralelo de las miofibrillas y la perfecta correspondencia de las respectivas bandas en cada miofibrilla da lugar a la característica estriación que da nombre al **músculo estriado** (ver figura 13). Con microscopía óptica, este músculo muestra bandas oscuras y claras alternantes. Con microscopía de luz polarizada las bandas oscuras son anisótropas y se llaman bandas A, mientras que las bandas claras son isótropas y se llaman bandas I. La banda I está dividida por una línea delgada y densa que se colorea de rojo con la hematoxilina fosfotúngstica y se denominada banda Z. La banda A (oscura) presenta en su centro una banda clara, la banda

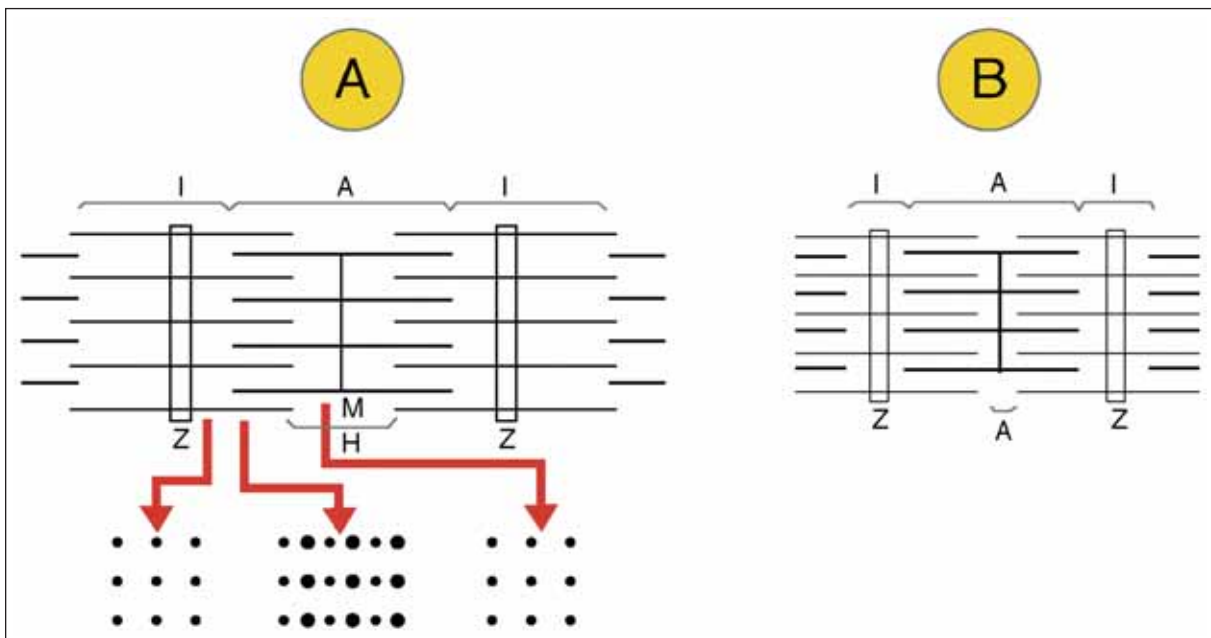


Figura 12. A). Estructura de la sarcómera comprendida entre dos bandas Z en condiciones de relajación. Los filamentos finos son de actina, los filamentos gruesos son de miosina. B). Acortamiento del sarcómera (aproximación de las bandas Z) por interpenetración de los filamentos de actina y miosina.



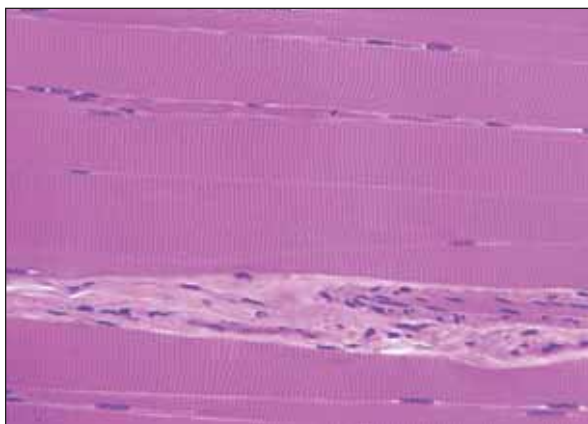


Figura 13. Microfotografía óptica donde se observa la estriación típica del músculo esquelético.

H, que a su vez está dividida por una banda oscura denominada banda M. A partir de estos datos es posible comprender la correlación de bandas con microscopía óptica y la correspondiente disposición de las proteínas contráctiles a nivel de microscopía electrónica.

### Sistema tubular

El sistema de túbulos del músculo está constituido por dos subsistemas: uno longitudinal, formado por distintos tubos anastomóticos, que presentan dilataciones saculares a intervalos regulares (retículo liso) y otro transverso (sistema tubular T), constituido por invaginaciones profundas de la membrana celular hacia el interior de la fibra muscular. La evidencia de comunicación entre el sistema T y el espacio extracelular se pone fácilmente de manifiesto mediante la utilización de distintos trazadores. En el punto de unión de las bandas I y A en los mamíferos (y en la región Z en los anfibios), ambos sistemas, longitudinal (retículo liso) y transversal (sistema T) se ponen en contacto, de modo que dos dilataciones saculares del primero engloban un túbulo del segundo. A esta estructura se la denomina tríada (ver figura 14).

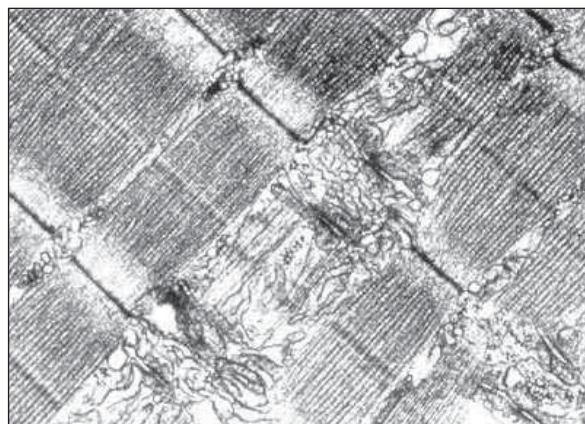


Figura 14. Sistema de conducción del músculo estriado.

En la figura 15 se representa el sistema tubular y su función de transmisión de la despolarización de la membrana hacia el interior de la fibra muscular, la movilización y el posterior secuestro del ión calcio, inductor propiamente de la interacción de las moléculas de actina y miosina.

### Membrana celular muscular

Llamada también sarcolema. Tiene un grosor de unos 75 Å y es de naturaleza lipoproteica. Constituye una barrera altamente selectiva que mantiene, por transporte activo, unas condiciones de potasio intracelular de unos 150 mEq/l. Debido principalmente a esta propiedad de retención de potasio intracelular, en relación al extracelular (unos 5 mEq/l), existe un potencial eléctrico negativo respecto al exterior celular de unos 85 mV. Esta diferencia de potencial se llama **potencial de reposo** de la membrana. Por la parte exterior de la membrana celular existe, además, una membrana basal, de unos 500 Å, compuesta por proteínas y mucopolisacáridos.

### Núcleos de las células musculares

Los núcleos de la fibra muscular se observan por debajo de la membrana celular (ver

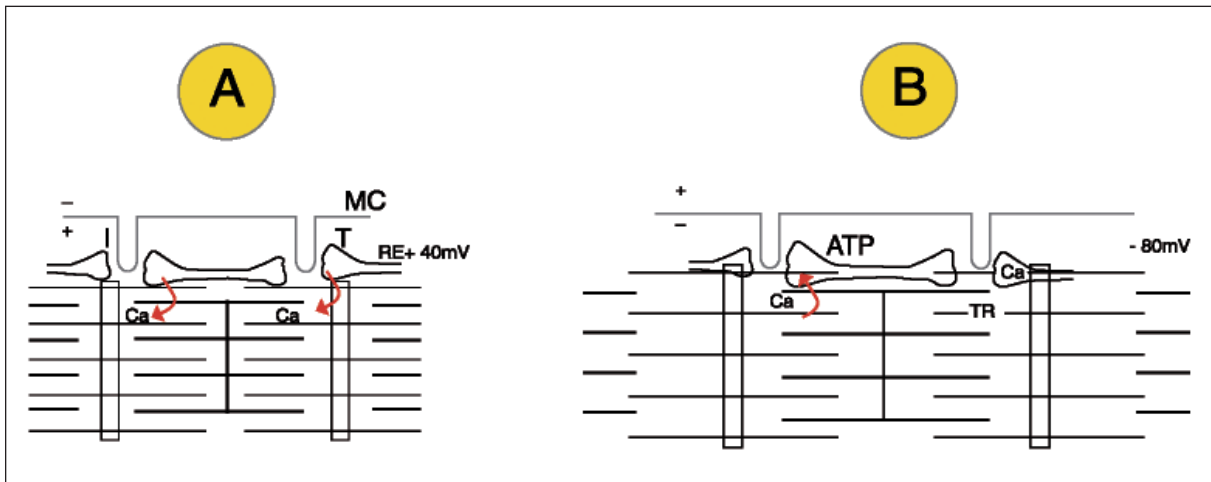


Figura 15. Estructura del sistema longitudinal: retículo endoplásmico (RE) y del sistema tubular (T), éste último en comunicación con el espacio extracelular como consecuencia de su continuidad con la membrana celular (MC). El conjunto de las dos dilataciones saculares de RE y el túbulo T, a nivel de la unión de I y A, se denomina tríada (TR). En A, bajo la acción del potencial de acción, la membrana se despolariza y se hiperpolariza (hasta unos 40 mV) alcanzando la tríada y liberándose iones calcio de los sáculos del retículo endoplásmico. El aumento de la concentración de calcio desencadena la contracción muscular. En B, el calcio es transportado nuevamente hacia el sistema tubular con consumo de ATP y por la acción de una ATPasa. Este mecanismo, en ausencia de un nuevo potencial de acción, determina la relajación de la fibra muscular.

figura 16). Sin embargo, existen otros núcleos, no separables de los anteriores ópticamente, que forman parte de unas células con esca-

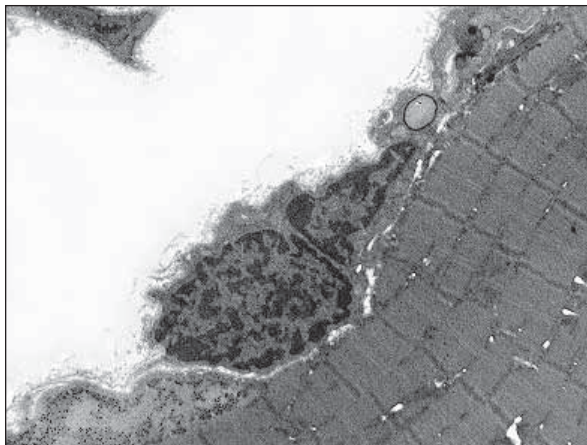


Figura 16. Mionúcleo (claro) y núcleo de la célula satélite (oscuro), ésta última queda englobada por la membrana basal (Martinez-Llorens, J.M.; 2004).

sas organelas y ausencia de filamentos, que se adosan perfectamente a la fibra muscular y que incluso quedan englobadas por la misma membrana basal. A estas células se las denomina **células satélites** y su presencia es de gran importancia en los fenómenos de regeneración muscular, como lo prueba su gran capacidad de división celular.

### La placa motora

En condiciones normales, la fibra muscular se encuentra inervada por nervios motores. Distalmente, el nervio mielínico se ramifica en múltiples ramas amielínicas, cada una de las cuales inerva una fibra muscular. El punto de contacto entre el axón nervioso y la fibra muscular (**unión neuromuscular**) es una zona altamente especializada diseñada para la rápida transmisión del impulso desde el axón hasta la fibra. En la zona mus-

cular, la membrana celular sufre invaginaciones múltiples, el citoplasma se dilata por la presencia de ribosomas, material granular y algunas mitocondrias, mientras que la membrana basal permanece recubriendo la fibra en toda su extensión. Esta estructura particular se llama **placa motora** (ver figuras 17, 18 y 19).

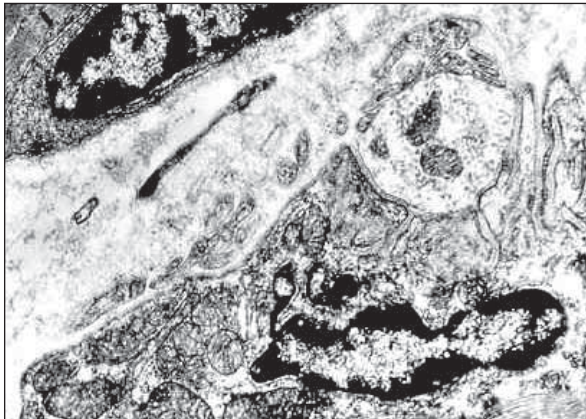


Figura 17. Placa motora donde aparece el aparato presináptico repleto de vesículas, la hendidura sináptica que contiene la membrana basal y la membrana postsináptica con múltiples invaginaciones.

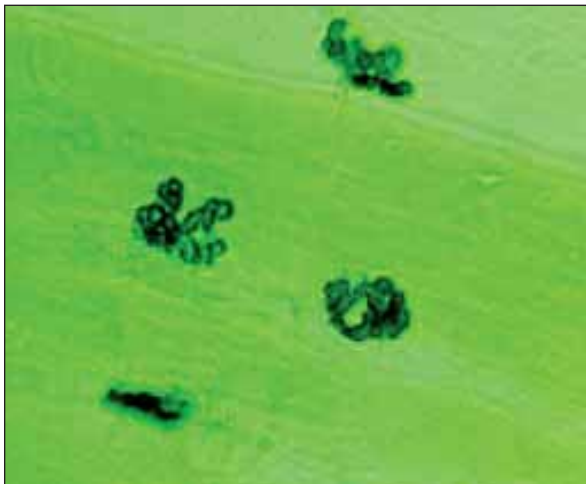


Figura 18. Técnica de esterasa de acetilcolina que pone de manifiesto la sinapsis mioneural.

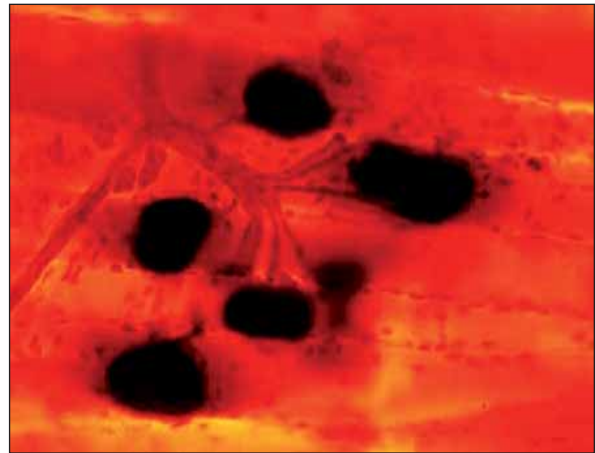


Figura 19. Tinción mixta de plata y esterasa de la acetilcolina para poner de manifiesto la innervación terminal.

Desde un punto de vista funcional comprende una zona presináptica que libera un neurotransmisor, la **acetilcolina** y, probablemente, sustancias tróficas, y una zona postsináptica que posee en su membrana una molécula a la que es capaz de fijarse la acetilcolina (**receptor de la acetilcolina**). Existe, además, un sistema de degradación del neurotransmisor constituido por un grupo de enzimas llamadas esterasas, de las cuales hay una específica para la acetilcolina, la esterasa de la acetilcolina, otra con especificidad para ésteres de colina, y una tercera de características no específicas.

### **EL POTENCIAL DE ACCIÓN Y SUS EFECTOS SOBRE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR**

La unión de la acetilcolina con su receptor en el aparato postsináptico determina la activación de un transportador asociado que modifica la permeabilidad de membrana a los iones sodio y potasio. Estas variaciones de permeabilidad se traducen en variaciones del potencial de membrana: potenciales de placa motora. Si las cantidades de acetilcolina son elevadas se produce una despolarización completa con cambio

de polaridad de la membrana que se denomina **potencial de acción**. Este potencial puede ser transmitido a zonas vecinas y por contigüidad a toda la membrana de la fibra muscular. La actuación de las distintas esterasas determinará, por otra parte, la destrucción de la molécula de la acetilcolina, evitando la persistencia de su acción a nivel del receptor. La despolarización de la membrana se transmite hacia el interior de la fibra a través del sistema T. La despolarización a través de las tríadas supone un hecho adicional fundamental: la liberación del ión calcio de los sacos laterales del retículo liso al medio interfibrilar. El aumento de la concentración de calcio a este nivel desencadena la interacción actina-miosina, con la consiguiente contracción muscular. El proceso de relajación se consigue gracias a un mecanismo activo dependiente de una ATPasa, que comporta el retorno del calcio al retículo sarcoplasmático.

### La unidad motora

En condiciones normales, una sola fibra nerviosa inerva varias fibras musculares. Desde un punto de vista funcional, la motoneurona del asta anterior de la médula espinal, su axón y las fibras musculares a las que inerva se comportan como una unidad, **la unidad motora**. La cantidad de fibras musculares inervadas por una unidad motora es variable, y depende del grado de precisión de los movimientos en cada músculo. Así, el músculo motor ocular externo tiene nueve fibras musculares por unidad, el primer músculo lumbrical alrededor de cien, y el músculo gemelo cerca de dos mil fibras musculares por unidad. Mediante la aplicación de distintos métodos, se han podido estudiar los campos inervados por una fibra nerviosa particular. Por ejemplo, la estimulación repetida y continua de una sola fibra nerviosa da lugar a la depleción de sustancias de reserva de las fibras musculares correspondientes. De esta manera, la tinción de PAS (ácido periodico Schiff) en secciones de un músculo demuestra una depleción de glucógeno en las fibras musculares sometidas a estímulos repetidos. Este

método ha permitido, por otra parte, demostrar que las fibras musculares pertenecientes a una unidad motora no están agrupadas, sino entremezcladas con otras pertenecientes a otras unidades motoras. Las propiedades enzimáticas y bioquímicas de las fibras musculares dependen de la fibra nerviosa. Este hecho da lugar a la segregación de distintos tipos de fibras musculares, cuyas propiedades vienen dadas por su inervación y otras propiedades, por el contrario, dependerán de la propia fibra muscular.

### Energía involucrada en la contracción muscular

La contracción muscular, en todas sus formas, consume energía. Esta energía se obtiene a partir del ATP que se consume en las diferentes etapas de: **1)** bombeo de iones a través del sarcolema (potencial de acción); **2)** cambios conformacionales de la miosina; **3)** liberación y recuperación del calcio por el retículo sarcoplásmico; **4)** unión del complejo troponina-tropomiosina; **5)** desplazamiento de los filamentos (contracción propiamente dicha); y **6)** separación de las cabezas de miosina (relajación) (Guyton, A.C. *et al.*; 2000). La cantidad de ATP (adenosintrifosfato) contenida en un músculo sólo permite mantener la contracción plena durante menos de un segundo. Por ello el ADP (adenosindifosfato), producto de su defosforilación, se refosforila para formar nuevo ATP en fracciones de segundo. La energía necesaria para la refosforilación proviene esencialmente de dos fuentes. La principal es la procedente del fosfato de creatina. Éste lleva un enlace fosfórico que al romperse libera la energía que permite fijar un nuevo ión de fosfato al ADP. Sin embargo, las cantidades disponibles de fosfato de creatina también son pequeñas (unas cinco veces las del ATP). Una segunda fuente de energía puede ser utilizada para reconstituir tanto el fosfato de creatina como el ATP, y es la proporcionada por el catabolismo de los alimentos (carbohidratos, grasas y proteínas). La mayor parte de su energía se libera durante el proceso de oxidación, que ocurre casi exclusivamente en las mitocondrias.



## Capítulo 3

# LOS MÚSCULOS RESPIRATORIOS EN INDIVIDUOS SANOS

---

### GENERALIDADES

El pulmón es el órgano encargado de realizar el intercambio gaseoso, obtiene oxígeno del aire y elimina anhídrido carbónico. Este proceso se denomina **respiración** y depende de la acción de diversos grupos musculares denominados **músculos respiratorios** (Blanco, M.L.; 2003).

La **inspiración** es un proceso activo que requiere que se produzca un gradiente de presiones. Esto se da por la contracción de los músculos inspiratorios. El músculo inspiratorio más importante, en reposo y en sujetos sanos, es el **diafragma**. Al contraerse, el contenido abdominal se desplaza hacia abajo y adelante, y aumenta el diámetro vertical de la caja torácica. Al mismo tiempo, los bordes de las costillas se levantan y se desplazan hacia fuera, y hacen que también aumente el diámetro transversal.

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

Los **músculos accesorios de la inspiración** comprenden, entre otros, los escalenos, que elevan las dos primeras costillas; los esternocleidomastoideos, que elevan el esternón e incluso el dorsal ancho (Orozco-Levi, M. *et al.*; 1995).

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

Los **músculos espiratorios** más importantes son los de la pared abdominal (**recto del abdomen, oblicuos mayor y menor, y transversos**), que al contraerse producen un aumento de la presión abdominal y empujan el diafragma hacia arriba. También los **músculos intercostales internos** participan en la espiración activa, traccionan las costillas hacia abajo y adentro, y reducen así el volumen torácico.

A continuación se describirán cada uno de los músculos que participan en el proceso respiratorio.

### MÚSCULOS INSPIRATORIOS

#### Diafragma

El diafragma representa el plano de separación de la caja torácica y el abdomen. Es un músculo estriado cuyas fibras se orientan de forma radial desde su zona central tendinosa a las estructuras óseas de la periferia (ver figura 20). Al ser comparado con músculos periféricos muestra una mayor tolerancia a la fatiga y mayor flujo sanguíneo, densidad capilar y capacidad oxidativa (Brooke, M.H. *et al.*; 1969).

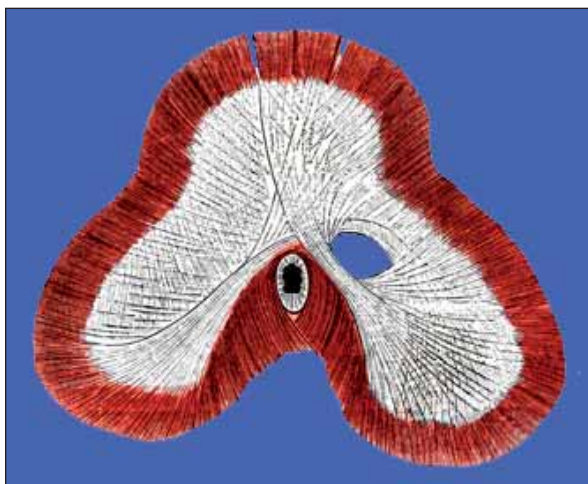


Figura 20. Diafragma, vista superior, modificado de Testut, L. et al.; 1969c.

Su contracción produce un descenso de su cúpula que lleva a un aumento de los diámetros anteroposterior y transversal de la caja torácica. El diafragma se contrae casi exclusivamente durante la inspiración (Epstein, S.K.; 1994). Cuando se acorta, el tendón central se mueve hacia abajo y actúa como un pistón, y aumenta la presión negativa intratorácica y la positiva intrabdominal, (ver figura 21). El diafragma de un adulto sano tiene un 80% de fibras resistentes a la fatiga (Rochester, D.F.; 1985) que lo capacitan para realizar trabajos de baja intensidad pero de larga duración. El término **diafragma** engloba en realidad lo que serían dos músculos íntimamente relacionados y unidos a través del tendón central: el costal y el crural (De Troyer, A. et al.; 1981). Esta diferenciación se hace no sólo desde un punto de vista anatómico sino también teniendo en cuenta su origen embriológico, su inervación y su función (Gibson, G.J.; 1989). Estudios experimentales con estimulación selectiva han demostrado que además se activan en forma diferente y que cada uno induce cambios conformacionales particulares en la caja torácica (De Troyer, A. et al.; 1982).

El **diafragma costal** se origina en el tendón central y se inserta en el apéndice xifoides (fibras esternales) y porción interna de las últi-

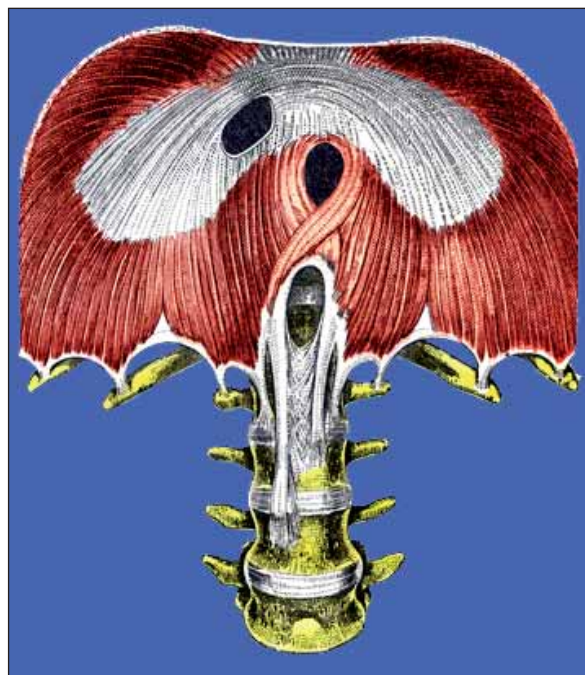


Figura 21. Vista antero-posterior del diafragma, modificado de Testut, L. et al.; 1969c.

mas seis costillas inferiores y cartílagos costales correspondientes (fibras costales). Se divide en dos partes, hemidiafragma derecho e izquierdo, cada una con forma de cilindro elíptico con cúpula curvada y de convexidad cefálica. Estas partes pueden actuar en forma casi independiente (Orozco-Levi, M.; 1995). La mayoría de las fibras del diafragma costal corren orientadas radialmente en sentido longitudinal, de arriba hacia abajo, y con líneas de tensión que se proyectan en serie (Whitelaw, W.A.; 1987). El **diafragma crural** se origina también en el tendón central pero se inserta en las tres primeras vértebras lumbares. La disposición de sus fibras es más compleja. Algunas se orientan radialmente hacia los ligamentos arqueados para insertarse en las apófisis transversas de la tercera vértebra lumbar y costillas inferiores. Otro grupo de fibras más posteriores se inserta en la porción anterolateral del cuerpo de las primeras vértebras lumbares. En el hiato esofágico, las fibras crurales se entrecruzan para formar parte del esfínter esofágico inferior (Mittal, R.K. et al.; 1988).

**Dimensiones del músculo diafragma.** En la tabla 3 se resumen los valores medios de las principales dimensiones anatómicas del diafragma humano, estudiado a partir de modelos de necropsia. La masa muscular propiamente dicha corresponde a un 95% del peso total del diafragma. En individuos sanos (Arora, N.S. *et al.*; 1982) se ha encontrado una fórmula de predicción del peso de este músculo en relación con el peso corporal total, a partir de una recta de regresión definida por:

$$\text{MMD (g)} = 4,18 \times \text{peso corporal (kg)} - 21,8$$

Donde MMD representa la masa muscular del diafragma. También el grosor, como el área del diafragma, está en relación lineal con el peso corporal total en individuos sanos (Casky, C.I. *et al.*; 1989; Rochester DF.; 1992). Algunas técnicas no invasivas, como la ecografía transparietal, a nivel de la zona de aposición del diafragma con la pared costal han permitido definir, además, que el grosor del diafragma guarda una relación directa y lineal con el volumen pulmonar en seres humanos (Orozco-Levi, M. *et al.*; 1995).

**TABLA 3. VALOR MEDIO DE LAS DIMENSIONES DEL DIAFRAGMA EN INDIVIDUOS SANOS**

(AMERICAN THORACIC SOCIETY.; 1995; BATE-SMITH, E.C. ET AL.; 1947; JEEJEEBHROY, K.N.; 1994)

VARIABLE	MAGNITUD
Peso	280 g
Masa muscular	260 g
Grosor	35 mm
Área del tendón central	150 cm <sup>2</sup>
Área muscular	750 cm <sup>2</sup>
Diámetro coronal	40 cm
Diámetro sagital	25 cm

La mayor parte de la información disponible respecto a las dimensiones del diafragma ha sido obtenida a partir de piezas necróticas, y hacen énfasis en las características del

diafragma costal. El diámetro transverso de este músculo escindido (aproximadamente 12 horas después del fallecimiento del paciente) es prácticamente igual a la longitud del arco transverso del diafragma antes de su extracción (Bate-Smith, E.C. *et al.*; 1947). Esto sugiere que el diafragma se contrae poco una vez es resecado. Aunque la magnitud de un potencial artefacto de contracción consecuente al *rigor mortis* no se ha controlado en los estudios antes mencionados, está bien establecido que el músculo esquelético tiende más a adquirir rigidez que a acortarse (Bate-Smith, E.C. *et al.*; 1947).

**Vascularización del músculo diafragma.** El aporte sanguíneo al diafragma depende de las **arterias mamaria interna, intercostales y frénicas (superiores e inferiores)** (ver figura 22). Estas se anastomosan para minimizar el riesgo de isquemia durante las situaciones de reducción del flujo (Comtois, A. *et al.*; 1987). Si éste es inadecuado puede aparecer fatiga o fracaso mecánico

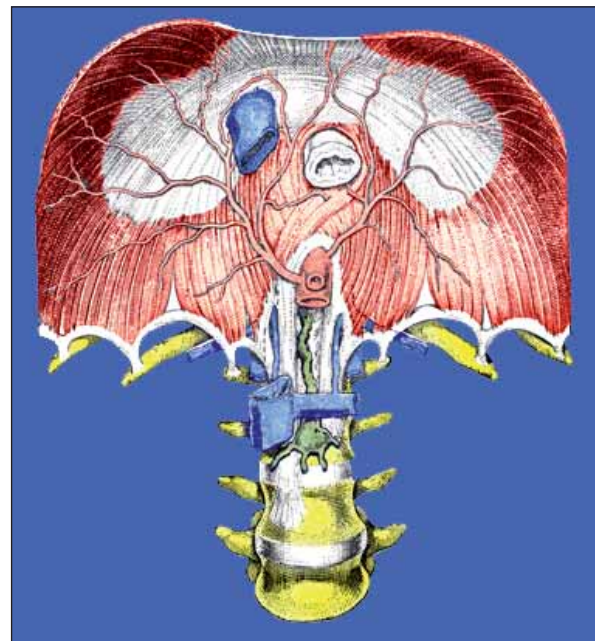


Figura 22. Irrigación del diafragma, modificado de Testut, L. *et al.*; 1969c.



del diafragma mientras que su restauración o aumento puede revertir o evitar el deterioro (Supinski, G. *et al.*; 1988). El flujo sanguíneo se incrementa progresivamente durante las situaciones de sobrecarga, pero alcanza una meseta cuando el índice tensión-tiempo ( $TT_1$ ) del músculo oscila alrededor de 0,2. A medida que la relación entre el tiempo inspiratorio y el tiempo total del ciclo ( $T_I/T_{TOT}$ ) aumenta, el tiempo de relajación del músculo disminuye. Por ello hay menor tiempo disponible para la perfusión, ya que la presión hidrostática de las fibras musculares contraídas tiende a colapsar los pequeños vasos interfibrilares. (Bellemare, F. *et al.*; 1983).

**Inervación del músculo diafragma.** Proviene de los *nervios frénicos izquierdo y derecho* (raíces nerviosas de C3 a C5). La eficiencia de la contracción del diafragma requiere que haya una correcta aferencia de la información respecto a la carga y posición del músculo. Sin embargo, el diafragma posee muy pocas terminaciones propioceptivas. Por ello, se asume que la compensación diafragmática ante las cargas esté mediada más por estructuras intrínsecas, como el aparato de Golgi en el tendón central, que a través de un verdadero *feed-back* mediado por vía neural (Bruce, E.N.; 1979). Algunos autores han propuesto la existencia de una vía refleja frénico-frénica o a través de los nervios intercostales (Jammes, Y. *et al.*; 1986). Por otra parte, se ha descrito recientemente que la activación del hemidiafragma izquierdo es de diferente magnitud a la del derecho (Galdiz, J. *et al.*; 1995). La integración de las señales aferentes desde diferentes grupos musculares es importante para la coordinación de la contracción muscular. La disnea puede aparecer asociada con la magnitud de tensión que detectan los mecanorreceptores en el músculo. Dado que se ha evidenciado la existencia de husos musculares anómalos en el diafragma, se ha propuesto que éstos podrían enviar información errónea a los centros de control de la respiración y contribuir a un incremento en la sensación disnéica (Serisier, D.E. *et al.*; 1982).

**Estructura celular del músculo diafragma.** Tanto desde el punto de vista embriológico como morfológico y funcional, el diafragma es un músculo esquelético estriado. No obstante, su actividad es continua y esencial para la vida, por lo que posee unas características específicas. Comparándolo con los músculos de los miembros, las fibras del diafragma tienen una mayor tolerancia ante la fatiga, mayor flujo sanguíneo, mayor capacidad oxidativa y mayor densidad capilar (Edwards, R.H.T. *et al.*; 1986). El diafragma se compone de numerosas unidades motoras. Cada una de ellas incluye cientos de fibras de uno de los tres tipos clásicos (I, IIa y IIx) (Dubowitz, V. *et al.*; 1973). El diafragma de individuos adultos sanos contiene aproximadamente un 80% de fibras resistentes a la fatiga (55% de tipo I, 25% de tipo IIa) comparado con el 40% de los músculos de las extremidades (Rochester, D.F.; 1985). Además, las fibras del diafragma tienen un mayor contenido mitocondrial que el mismo tipo de fibra de los músculos de las extremidades (Edwards, R.H.T. *et al.*; 1986). Más que una simple diferencia histológica, el tipo de fibra determina el rango de posibles respuestas contráctiles. Los músculos con altas proporciones de fibras tipo I están mejor equipados para esfuerzos sostenidos de baja intensidad, mientras aquellos con predominancia de tipo II son óptimos para desarrollar trabajo de alta potencia pero corta duración. En los músculos respiratorios se combinan estas dos propiedades, y permiten así tanto la resistencia a la fatiga necesaria para movilizar durante toda la vida el volumen corriente como la ejecución de actividades de alta demanda (p.e. ventilación durante el ejercicio, suspirar o toser). La proporción de cada tipo de fibras en un músculo es dinámica, pues puede cambiar en respuesta a diversos factores. Entre estos, la edad, el estado nutricional protéico-calórico, el entrenamiento físico y la sobrecarga crónica (mecánica o ventilatoria) del sistema respiratorio (Epstein, S.K.; 1994). Por otra parte, el diafragma difiere funcionalmente de otros músculos en cuanto se contrae ante cargas resistivas (vías aéreas) y elásticas (pared torácica y pulmones) más que ante fuer-

zas de inercia. Además, su posición de reposo está determinada por el equilibrio de las fuerzas elásticas del tórax y de los pulmones.

### Los músculos intercostales externos

Estos son músculos delgados que se encuentran situados en el plano más superficial de los espacios intercostales. Sus fibras están orientadas de forma oblicua hacia la línea media anterior. (ver figura 23) Su acción inspiratoria se fundamenta en la capacidad de traccionar la costilla inmediatamente inferior en sentido caudo-cefálico y aumentar así el diámetro del tórax. La irrigación del músculo intercostal externo es escasa, recibe finas arteriolas de la arteria intercostal o de sus ramas. Está inervado en su parte posterior por ramos cortos del nervio intercostal, algunas veces

por un filete más largo que se desprende de la parte posterior del espacio intercostal (Testut, L. *et al.*; 1969h). Al igual que el diafragma, presenta un predominio de fibras tipo I (60%). Del 40% de fibras tipo II un 25% corresponde a las de tipo IIx (Hards, J.M. *et al.*; 1990; Jimenez-Fuentes, M.A. *et al.*; 1998; Martínez-Llorens, J. *et al.*; 2002).

### Los músculos intercostales paraesternales

Estos músculos corresponden a la porción condro-esternal bilateral de los músculos intercostales internos. Su activa participación durante la fase inspiratoria ha sido comprobada electromiográficamente. Su contracción contribuye al acortamiento de los espacios intercostales y a la elevación de las costillas. En ausencia de enfermedad se ha encontrado que un 50-60% de sus fibras corresponden a tipo I y un 40-50% a fibras tipo II (Kelsen, S.G. *et al.*; 1993).

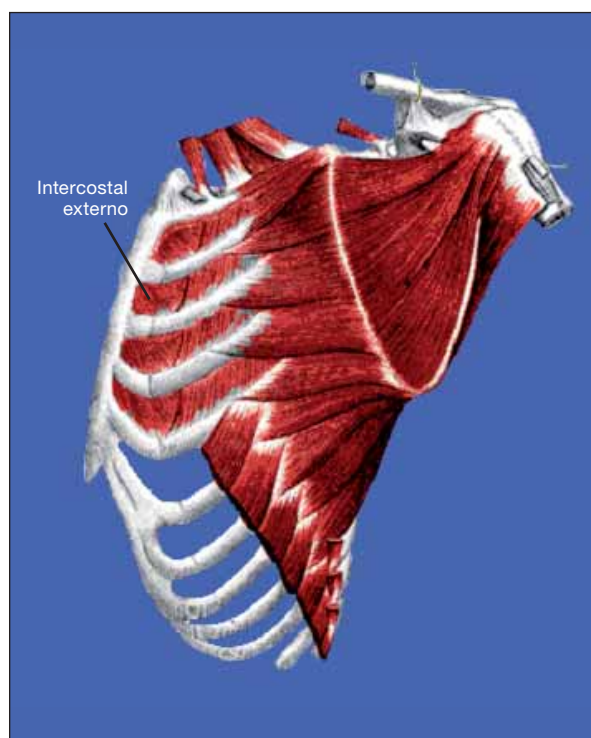


Figura 23. Vista antero-lateral de los músculos intercostales externos, modificado de Testut, L. *et al.*; 1969f.

## LOS MÚSCULOS ESPIRATORIOS

La espiración es un fenómeno pasivo, al menos en condiciones de reposo y en ausencia de enfermedad. Sin embargo, en condiciones de ejercicio o en presencia de enfermedades obstructivas del flujo aéreo, los **músculos intercostales internos (salvo los paraesternales) y los de la pared abdominal (transverso, recto anterior, y oblicuos mayor y menor)** (ver figura 24), se reclutan y activan con tal de incrementar la presión intratorácica y abdominal, descender las costillas y desplazar al diafragma en sentido cefálico. Todo ello se traduce en la posibilidad de realizar esfuerzos espiratorios como la tos, el estornudo, o la espiración contra una sobrecarga mecánica (p.e. broncoespasmo); inclusive se ha involucrado la acción de los músculos espiratorios en la aparición de PEEP<sub>i</sub> (presión intrínseca positiva al final de la espiración) (Ninane, V.; 1997). Esta contracción espiratoria podría disminuir el trabajo del diafragma al iniciar la siguiente

inspiración a partir del retroceso elástico del sistema. Por su parte, los músculos abdominales e intercostales internos han sido menos estudiados. Datos de nuestro grupo demuestran que el oblicuo externo del abdomen muestra, en promedio un 30-60% de fibras tipo I (Hernandez, N. *et al.*; 2001; Ramirez-Sarmiento, A. *et al.*; 2006).

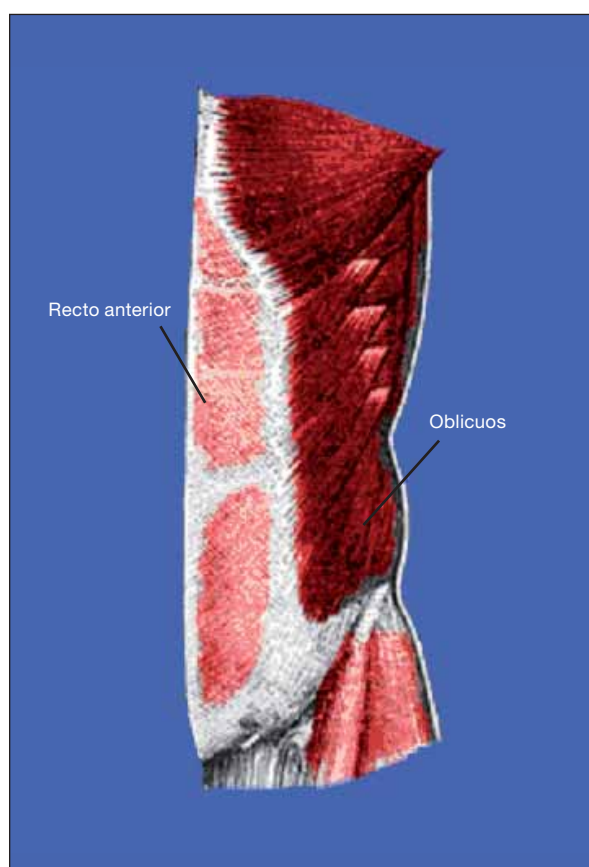


Figura 24. Músculos espiratorios de la pared abdominal, modificado de Testut, L et al.; 1969b.

### **MÚSCULOS ACCESORIOS DE LA RESPIRACIÓN**

La mayoría de los músculos de la región del cuello, cintura escapular y región superior del tórax participan en la inspiración durante

circunstancias especiales. Entre ellos destacan los **músculos escalenos**, que se extienden desde las apófisis transversas de las últimas cinco vértebras cervicales hasta la superficie anterior de la primera y segunda costillas. Su contracción colabora con el ascenso de las costillas superiores y se evidencia como la retracción del cuello y espacio supraclavicular durante la inspiración forzada. También el **músculo esternocleidomastoideo**, que se extiende desde la apófisis mastoideas hasta la parte anterior del tórax, y se inserta en la clavícula y esternón. Su contracción igualmente ayuda a la elevación de la caja torácica superior. El **músculo dorsal ancho**, a su vez, se extiende desde la cara externa de las últimas cuatro costillas, la cresta ilíaca y apófisis espinosas de las últimas vértebras dorsales y lumbares hasta la corredera bicipital del húmero. Si se fija en este lugar, su contracción colabora con la elevación de las costillas y ayuda en la inspiración.

### **TÉCNICAS PARA LA EVALUACIÓN FUNCIONAL DE LOS MÚSCULOS RESPIRATORIOS**

En los últimos años se ha hecho énfasis en la evaluación funcional de los músculos respiratorios en seres humanos justificada por motivos clínicos y de investigación. A continuación se describen una serie de fundamentos técnicos y recomendaciones prácticas sobre la metodología de evaluación funcional (fuerza y resistencia) *in-vivo* y no-invasiva de los músculos respiratorios en seres humanos. El resumen de estos conceptos ha estado basado en la experiencia de más de una década de la **Unitat de Recerca en Múscul i Aparell Respiratori del Hospital del Mar - IMIM** en este tipo de evaluaciones funcionales. Este apartado incluye las bases fisiológicas y fisiopatológicas de los cambios en la función de estos músculos en pacientes con enfermedades respiratorias.

La aplicación de estas técnicas abarca tanto la evaluación clínica de pacientes seleccio-

nados como el baremo de criterios para la asignación de estrategias específicas de intervención (p.e. entrenamiento inspiratorio, entrenamiento espiratorio, tratamiento anabolizante, intervención nutricional, etc.). En este sentido, una de las propuestas actuales es la asignación de los esquemas de entrenamiento muscular de acuerdo a los resultados de las pruebas de función muscular respiratoria. Específicamente se ha sugerido hacer entrenamiento de fuerza (cargas elevadas, corta duración) o de resistencia (cargas moderadas, períodos prolongados) en aquellos pacientes que tengan deteriorada una u otra característica. De esta forma la asignación de los esquemas de entrenamiento podrán ser personalizados de una forma más racional, se optimizan los recursos, y se incide de una forma específica sobre las prioridades que denota la disfunción muscular de cada paciente.

La eventual realización de estudios epidemiológicos multicéntricos permitiría evaluar el valor predictivo de la función muscular respiratoria respecto al deterioro funcional global, calidad de vida e inclusive mortalidad de pacientes con enfermedades respiratorias crónicas.

Existen diversas técnicas que permiten la valoración funcional del diafragma, teniendo en cuenta las propiedades de fuerza y resistencia. **La fuerza** se define como la tensión (o trabajo) máximos que un músculo puede generar. En el caso del diafragma será equivalente a la presión máxima que puede producir en una **inspiración forzada máxima**. Generalmente se evalúa durante contracciones tanto isométricas como anisométricas que, desde el punto de vista funcional, son típicamente anaeróbicas. **La resistencia** incluye el concepto de **tiempo** durante el cual un músculo puede generar una tensión (o trabajo) de determinada magnitud **antes de desarrollar fatiga**. Es evaluada con maniobras dinámicas durante períodos determinados. Desde el punto de vista funcional, estas maniobras pueden ser mixtas o predominantemente aeróbicas según el caso.

## Pruebas para evaluar la fuerza de los músculos respiratorios

La fuerza de los músculos respiratorios se evalúa con dos grupos de técnicas, clasificadas según la naturaleza de la maniobra que se ejecute. Las **maniobras respiratorias isométricas (o estáticas)**, denominadas así porque no se acompañan de flujo aéreo, implican ejecución de la contracción muscular a isovolumen pulmonar. Permiten evaluar los músculos respiratorios durante una contracción isométrica. Las **maniobras dinámicas (anisométricas)** son aquellas que se realizan con la vía aérea permeable, lo que permite establecer flujo aéreo. Para ambos grupos de maniobras, la medición de los cambios de presión se puede realizar a cualquier volumen pulmonar.

La técnica más clásica para evaluar la fuerza de los músculos respiratorios es la medición de las **presiones inspiratorias máximas** durante una maniobra de Müller. La presión inspiratoria máxima puede ser medida en nariz, en boca (**PI<sub>max</sub>**) (Black, L.F. *et al.*; 1969; Morales, P. *et al.*; 1997; Wilson, D.O. *et al.*; 1985) (ver figura 25), o en esófago (**Pes<sub>max</sub>**) y suele obtenerse a partir de una espiración máxima (RV: volumen residual). La medición en nariz o boca presenta como ventajas que no es inva-

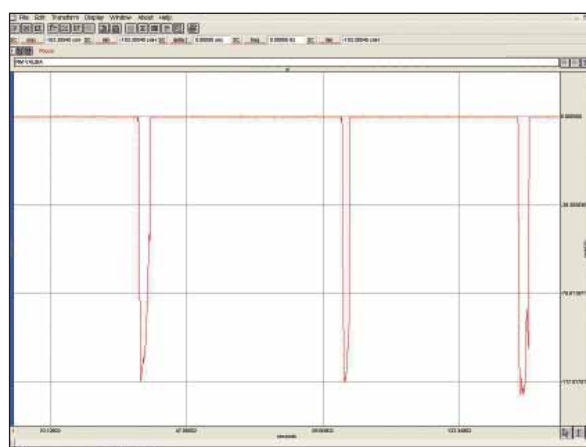


Figura 25. Registro de presión inspiratoria máxima en boca (PI<sub>max</sub>).

siva, es sencilla de realizar, es aceptablemente reproducible y cuenta con la posibilidad de utilizar manómetros ya comercializados. No obstante, todas las maniobras están directamente asociadas al grado de colaboración y aprendizaje por parte del individuo. Para solventar ésto último se puede utilizar la técnica de estimulación eléctrica del nervio frénico, centros cervicales o córtex cerebral.

La señal producida se conoce como presión inspiratoria *twitch* (Mier, A. *et al.*; 1989). Además, se puede utilizar la técnica de estimulación magnética, que puede asegurar la estimulación del tronco nervioso sin aplicar altos voltajes sobre la piel. (Man, W.D. *et al.*; 2004).

Es importante resaltar que la medición de la  $PI_{max}$  no permite discriminar la participación de los diferentes grupos musculares de la inspiración (p.e. diafragma frente a accesorios). Por otra parte, tanto la  $PI_{max}$  como la  $Pes_{max}$  pueden verse interferidas por la contracción de músculos extratorácicos (p.e. buccinadores). Con el objetivo de disminuir la variabilidad intraindividual se ha propuesto repetir las maniobras varias veces hasta obtener tres valores de presión que no difieran más de un 5%, tomando a continuación el más alto. También se ha sugerido disminuir las fugas con boquillas especiales y controlar con las manos del investigador la utilización de la musculatura de las mejillas (Mayos, M. *et al.*; 1991).

En sujetos sanos la  $PI_{max}$  está fundamentalmente determinada por seis factores: la edad, sexo, desarrollo muscular global y las relaciones fuerza-longitud, fuerza-frecuencia y fuerza-velocidad de los músculos inspiratorios (Rochester, D.F. *et al.*; 1983).

Para valorar específicamente la fuerza del diafragma se requiere la medición de la **presión transdiafragmática (Pdi)**. Dado que la contracción de este músculo genera simultáneamente cambios de presión en el tórax (presión negativa) y el abdomen (presión positiva), la di-

ferencia de estas dos representa exclusivamente la presión generada por el diafragma, así:

$$Pdi = Pga - Pes$$

Donde **Pga** es la presión gástrica y **Pes** la esofágica. El componente esofágico permite evaluar en conjunto la función de los músculos inspiratorios, mientras que el **índice Pes/Pdi** representa la fracción de **Pdi** que se traduce en presión pleural. La medición de estas presiones en seres humanos se realiza habitualmente con dos sondas que incorporan un balón distal. Uno se sitúa en la luz esofágica y otro en la cavidad gástrica (ver figura 26). Las sondas se colocan a través de la nariz y se conectan a sendos transductores de presión y a un sistema de registro (Laporta, D. *et al.*; 1985). También pueden colocarse sondas ya dotadas de transductores en sus extremos.

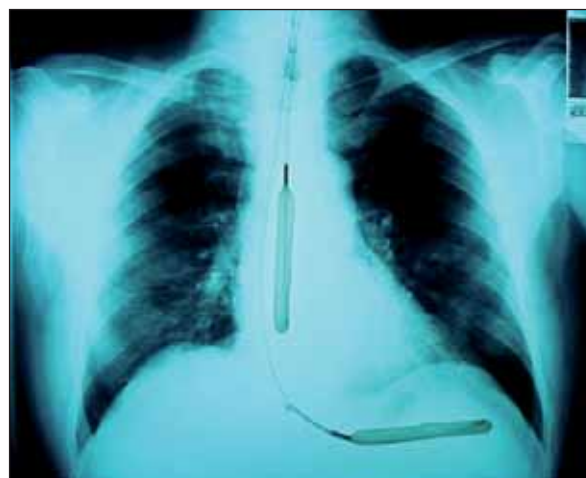


Figura 26. Imagen simulada de una determinación de Pdi, con las sondas situadas en esófago y estómago.

La fuerza que el diafragma es capaz de generar en una contracción **máxima ( $Pdi_{max}$ )** se evalúa especialmente durante la ejecución de maniobras inspiratorias máximas (Gea, J. *et al.*; 1993a; Gea, J. *et al.*; 1993c; Laporta, D. *et al.*; 1985). Las maniobras más utilizadas con este objetivo son:

- **Maniobra de inspiración forzada con vía aérea permeable.** La más conocida es la **Pdi<sub>max-Sniff</sub>**. Esta técnica es sencilla (Laroche, C.M. *et al.*; 1988) y en enfermos evaluados en nuestro laboratorio no ha mostrado diferencias con la **Pdi** usando la maniobra de Müller (**Pdi<sub>max-Müller</sub>**). Asimismo, aparece como la más reproducible en pacientes con EPOC (Aran, X. *et al.*; 1992b).

- **Maniobra de inspiración máxima hasta capacidad pulmonar total.** (*Total Lung Capacity [TLC], sigla en inglés*) Es la llamada **Pdi<sub>max-TLC</sub>**. Su principal desventaja es la dificultad para ser realizada por pacientes.

- **Maniobra de inspiración forzada contra la vía aérea cerrada.** Es en realidad una maniobra estática (Maniobra de Müller) y es conocida como **Pdi<sub>max-Müller</sub>**. Representa la fuerza generada durante la contracción isométrica del diafragma. Algunos autores incluyen un esfuerzo expulsivo abdominal simultáneo o la colocación de bandas o cinturones en el abdomen. Aunque de estas formas la **Pdi** puede tener valores absolutos mayores, existen dudas sobre su significado fisiológico.

Las principales desventajas de las técnicas descritas para la medición de la **Pes** y **Pdi** están representadas por los caracteres invasivo de su medición y voluntario de las maniobras. Para lo primero, algunos autores han propuesto la medición de la **PI<sub>max</sub>** en nariz (Héritier, F. *et al.*; 1992), boca o nasofaringe (Mulvey, D.A. *et al.*; 1991) como alternativas a la medición de la **Pes** con los métodos convencionales. Para lo segundo, se han diseñado técnicas de estimulación externa para inducir contracción del diafragma. Similar a lo referido anteriormente, la **Pdi<sub>max</sub>** permite evaluar la fuerza del diafragma con un estímulo externo (eléctrico o magnético) del nervio frénico o de los centros respiratorios, sin que se requiera una maniobra voluntaria por parte del sujeto (Gea, J. *et al.*; 1993b). Los nervios frénicos pueden ser estimulados magnéticamente de tres diferentes formas: **1) Estimulación cervical magnética** (CMS, sigla en inglés) fue la primera en ser descrita (Similowski, T. *et al.*; 1989) y consiste en aplicar un estimulador circular sobre la nuca, centrado aproximada-

mente a nivel de la apófisis espinosa de la séptima vértebra cervical. **2) Estimulación magnética anterior** (AMS, sigla del inglés) se diseñó para obtener contracción diafragmática bilateral (Polkey, M.I. *et al.*; 2000) y **3) Estimulaciones magnéticas anterolaterales del nervio frénico**, tanto **unilateral** como **bilateral** (UMS y BAMPS, de las siglas en inglés) (Man, W.D. *et al.*; 2002; Mills, G.H. *et al.*; 1996). En la figura 27 se pueden apreciar la manera como se realizan las técnicas anteriormente mencionadas. Una ventaja adicional es que permiten evaluar tanto la contracción global como la de un sólo hemidiafragma, según sean uno o dos los centros o nervios estimulados. Desde un punto de vista funcional, los valores de la **Pdi<sub>max-Twitch</sub>** son aproximadamente un 20% menores que los de la **Pdi<sub>max-Sniff</sub>** (Martinez-Llorens, J.M. *et al.*; 2006). Nuestro grupo ha sugerido la determinación de la **Pes**, **Pga** y **Pdi** tanto durante maniobras de espiración forzada (**PE<sub>max</sub>**) como de tos (**Pes<sub>Tos</sub>**, **Pga<sub>Tos</sub>**, **Pdi<sub>Tos</sub>**) (Gallart, L. *et al.*; 1995) dentro de las técnicas de evaluación de la fuerza de los músculos respiratorios. La relevancia clínica de estas determinaciones es todavía motivo de estudio, pero parecen reflejar una participación activa del diafragma en el esfuerzo expulsivo tusígeno (Aguar, M.C. *et al.*; 1994).

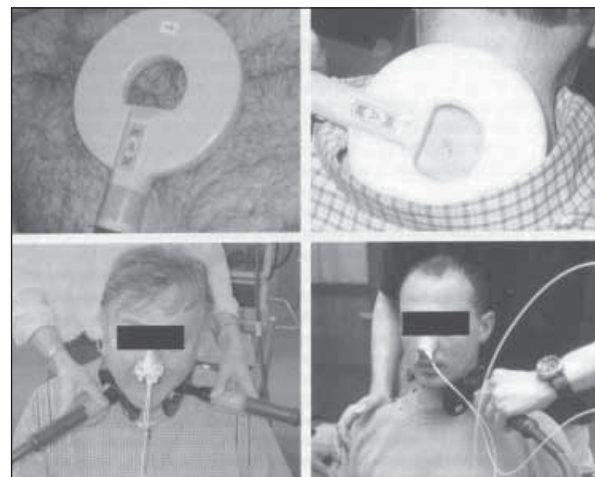


Figura 27. Diferentes técnicas de estimulación magnética del nervio frénico, modificado de Man, W.D. *et al.*; 2004.

## Evaluación de la reserva funcional de los músculos respiratorios deducida a partir de las mediciones de fuerza

Se han diseñado diversos métodos que tratan de evaluar el estado funcional y riesgo de desarrollar fatiga de los músculos respiratorios. Estos métodos pueden aplicarse bien sea en condiciones de sobrecarga ventilatoria o de debilidad muscular, y tanto en individuos sanos como en enfermos (p.e. EPOC, patologías neuromusculares). Las más utilizadas son:

**Técnicas basadas en la mecánica de contracción.** En primer lugar, el **índice tensión-tiempo (TT)**. Incluye las dos variables que determinan el trabajo muscular: la tensión o fuerza generada y la duración de la misma. Este índice ha sido claramente definido para músculos de las extremidades. Por extensión, para los músculos inspiratorios viene determinado por una hipérbola generada a partir de la fórmula:

$$TT_I = (PI/PI_{\max}) \times (T_I/T_{TOT})$$

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

$$TT_I = (Pes/Pes_{\max}) \times (T_I/T_{TOT})$$

Esta misma puede ser aplicada tanto para la evaluación específica del estado funcional del diafragma (**di**), según el enunciado:

$$TTdi = (Pdi/Pdi_{\max}) \times (T_I/T_{TOT})$$

Tal y como se deduce de estas fórmulas, el primer cociente expresa la magnitud de tensión que el (los) músculo(s) genera(n) en cada contracción en relación a su capacidad máxima. Cuando este cociente aumenta, la reserva del músculo disminuye. El segundo cociente expresa la duración de la contracción muscular en cada ciclo respiratorio. La diferencia con la unidad expresa el tiempo disponible para la relajación muscular. Cuando este cociente aumenta, hay

un menor tiempo para la perfusión del músculo. Por ello la reserva también disminuye. En individuos sanos y en condiciones basales, el **TTdi** oscila alrededor de 0,02. En pacientes con EPOC o patología neuromuscular el valor puede ser 2 a 5 veces mayor. A partir de trabajos experimentales se ha logrado definir que un **TTdi** mayor a 0,15 es prácticamente imposible de mantener por períodos mayores de 1 hora. Por ello, y aunque el **TTdi** no permite diagnosticar fatiga muscular, sí permite valorar la situación funcional del músculo y estimar el riesgo a desarrollarla.

Otro método para la evaluación de la reserva ante la fatiga es el **índice de relajación máxima (MRR, sigla en inglés)**. Se considera uno de los indicadores más precoces de los cambios que se suceden en la dinámica de la fatiga muscular. Se basa en el hecho fisiológico de que la relajación muscular es un fenómeno activo, que consume energía, y es lábil a las modificaciones del medio intracelular (pH, niveles de ATP, etc.). El **MRR** se define como el porcentaje de caída máxima de la presión medida en los primeros 100 msec de la relajación muscular (Aran, X. *et al.*; 1992a; Esau, S.A. *et al.*; 1983b; Esau, S.A. *et al.*; 1983a).

Recientemente nuestro grupo ha propuesto un método no invasivo para efectuar una aproximación al **MRR** del diafragma al utilizar la ultrasonografía a través de la pared torácica en la zona de aposición del músculo (Orozco-Levi, M. *et al.*; 1995). Permite evaluar el grosor del diafragma costal (estado trófico) y sus cambios durante la contracción y la relajación (dinámica de contracción). Desde un punto de vista clínico tiene como ventaja su carácter no-invasivo, reproducible y de poder realizarse en la cabecera del paciente, según el caso. Los resultados experimentales en sanos han demostrado que la relajación del diafragma describe un deterioro progresivo (enlentecimiento de la relajación) cuando se respira ante cargas externas, y alcanza un valor mínimo en el momento de la claudicación. Esto ha hecho suponer que la técnica puede ser utilizada en la evaluación de la mecánica del diafragma y su reserva funcional en enfermos

en falla ventilatoria aguda o en protocolos de destete de la ventilación mecánica. No obstante, los estudios clínicos aún están en desarrollo.

**Técnicas basadas en las señales electrofisiológicas.** Entre ellas la más conocida es el **índice de altas/bajas frecuencias** (índice H/L, sigla en inglés), medido sobre la señal electromiográfica (EMG). Este índice disminuye y tiende a invertirse precozmente cuando la dinámica de la fatiga muscular se ha iniciado (Moxham, J. *et al.*; 1982). La detección de señales EMG adecuadas y su procesamiento no son sencillos, pero recientemente se ha diseñado un sofisticado sistema experto para optimizar el análisis (Sinderby, C. *et al.*; 1995).

**Técnicas basadas en la señal vibratoria de la contracción.** La contracción muscular genera unas señales vibratorias de baja frecuencia cuyo estudio y análisis se conoce como *fonomiografía* o *vibromiografía*. La respuesta de los transductores (acelerómetros) es proporcional a la aceleración del sistema, por lo que se supone que la señal obtenida puede reflejar los movimientos respiratorios generados por la contracción de diversos músculos. Recientemente se ha validado en modelos animales la utilización de acelerómetros de superficie para monitorizar la actividad del diafragma comparándolos con otras técnicas (medición de **Pdi**, electromiografía (**EMG**)) (Fiz, J.A. *et al.*; 1995). Su aplicación en seres humanos podría tener utilidad en la valoración no invasiva de la función diafragmática.

**Evaluación de la resistencia del diafragma y demás músculos inspiratorios.** La resistencia muscular se refiere a la capacidad que tienen los músculos para generar y mantener un nivel determinado de tensión o trabajo. Esta capacidad depende directamente del número de capilares y mitocondrias, así como de la capacidad enzimática oxidativa de cada músculo. La resistencia de un músculo frente a un trabajo es el resultado de la compleja bioenergética muscular. Desde un punto de vista conceptual, la resistencia estará determinada

por la energía almacenada ( $E_{ALM}$ ), la energía liberada ( $E_{LIB}$ ) para los eventos de contracción y relajación, el flujo sanguíneo ( $Q$ ) y el tiempo de duración del ejercicio o tiempo límite ( $T_{lim}$ ), de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$T_{lim} = (E_{ALM}) / (E_{LIB} \times Q)$$

Además, el trabajo muscular ( $W_{mus}$ , sigla en inglés) posible estará representado por la relación entre la energía disponible y la eficiencia (**Ef**), Así:

$$W_{mus} = E_{ALM} \times Ef$$

### Pruebas generales para evaluar la resistencia de los músculos respiratorios

Existen varias técnicas para la evaluación de la resistencia muscular respiratoria. Algunas son más específicas que otras y logran evaluar cada grupo respiratorio con relación a su función. Sin embargo, las más comúnmente utilizadas son las siguientes:

**Pruebas de esfuerzo físico general.** Algunos autores han propuesto que las pruebas de marcha de 6 o 12 minutos, cicloergometría, cinta rodante o el sentarse/levantarse pueden evaluar la resistencia de los músculos respiratorios en los pacientes portadores de EPOC, asma, secuelas post-tuberculosas u otras enfermedades. Su aplicación está bien definida cuando se desea evaluar íntegramente la adaptación y reserva al esfuerzo físico general. A pesar de ello, el carácter multisistémico de estas pruebas involucra también la participación del aparato cardiovascular y del sistema muscular esquelético global, lo cual dificulta la evaluación específica de los grupos musculares inspiratorio o espiratorio.

**Pruebas de ventilación voluntaria máxima.** Estas últimas corresponden a la máxima ventilación que un individuo puede mantener durante un período de al menos 15 segundos, con una frecuencia respiratoria mayor de 80 por



minuto. Durante la prueba el paciente se conecta a un neumotacógrafo que permite registrar el volumen corriente, la frecuencia respiratoria y el patrón respiratorio durante al menos 12-15 segundos. El paciente debe respirar lo más rápido y profundo que le sea posible. Es una maniobra de carácter volitivo e inespecífica en lo que respecta a la evaluación funcional muscular, puesto que implica el reclutamiento simultáneo de la musculatura inspiratoria y espiratoria. En pacientes con enfermedades obstructivas como la EPOC o el asma la variable resultado dependerá de forma importante del grado de obstrucción del flujo aéreo y no sólo de la función muscular.

### Pruebas específicas para evaluar la resistencia de los músculos respiratorios.

Para evaluar específicamente la resistencia de los músculos respiratorios es necesario disponer de un circuito diferencial o válvula de dos vías. Esto permite que la sobrecarga mecánica se pueda aplicar exclusivamente sobre el grupo muscular que se desea evaluar, inspiratorio o espiratorio según el caso. El fundamento para evaluar específicamente la resistencia muscular respiratoria implica contar con un sistema de sobrecarga mecánica de estos músculos y medir la presión máxima tolerada o el tiempo de aguante, dependiendo de si la prueba es incremental o no, respectivamente.

#### Cargas Inspiratorias Incrementales.

Hace cerca de dos décadas se describió un prototipo de válvula con mecanismo de apertura umbral (Nickerson, B.G. *et al.*; 1982). Posteriormente, se propuso la evaluación funcional de la resistencia muscular inspiratoria al imponer cargas incrementales cada 2 minutos, emulando una prueba cicloergométrica (Marty, J.B. *et al.*; 1987). Recientemente, nuestro grupo ha descrito una válvula con mecanismo de apertura umbral para ser aplicada en la evaluación de la resistencia de los músculos respiratorios (Orozco-Levi, M. *et al.*; 2001a). La variable resultado representativa de la resistencia muscular respiratoria está definida como la

carga máxima (en términos de presión) contra la que el individuo es capaz de respirar al menos un minuto antes de claudicar. Este valor se ha definido como carga o presión máxima tolerada (**PMT, en cmH<sub>2</sub>O**) o sostenible (**SIP, del inglés *sustainable inspiratory pressure*, o SEP, de *sustainable expiratory pressure***) (ver figura 28). En sujetos normales la **PMT** corresponde aproximadamente al 60% de la **PI<sub>max</sub>** o **PE<sub>max</sub>**, según el caso. Se ha demostrado que la **PMT** puede ser un 50% mayor si la carga inspiratoria es aplicada en forma progresiva (p.e. 50 g, cada 2 minutos) que si se instaura inicialmente. Para la ejecución de la prueba el individuo se coloca en posición sedente, con una pinza de obstrucción nasal y respira espontáneamente a través de una boquilla de tipo submarinista. Esta boquilla se conecta a la válvula de dos vías que permite independizar los dos circuitos, inspiratorio y espiratorio, mientras se registra de forma continua la presión generada a nivel de la boca en cada esfuerzo respiratorio.

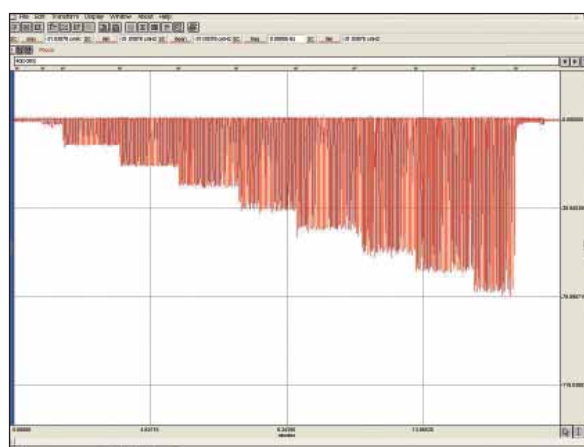


Figura 28. Registro de PMT inspiratoria.

**Cargas Inspiratorias Constantes.** Se propuso aplicar cargas submáximas constantes para realizar la evaluación de la resistencia de los músculos inspiratorios (Fiz, J.A. *et al.*; 1998) (ver figura 29). Consideramos que el ejercicio ante carga constante ofrece una información complementaria a la que se obtiene con la an-

terior prueba incremental. Probablemente la carga constante sea la prueba por excelencia que mejor refleja un ejercicio de resistencia. La variable resultado se interpreta en términos de tiempo (minutos) durante el cual el individuo es capaz de respirar ante la carga impuesta. Se conoce como tiempo de aguante o límite ( $T_{lim}$ ). El paciente debe estar en posición sedente, cómodo, utilizando una pinza nasal y respirando a través de una boquilla de tipo submarinista conectada a la válvula de dos vías a través de la cual se aplicará la carga. En general la carga se normaliza al 80% de la **PMT**.

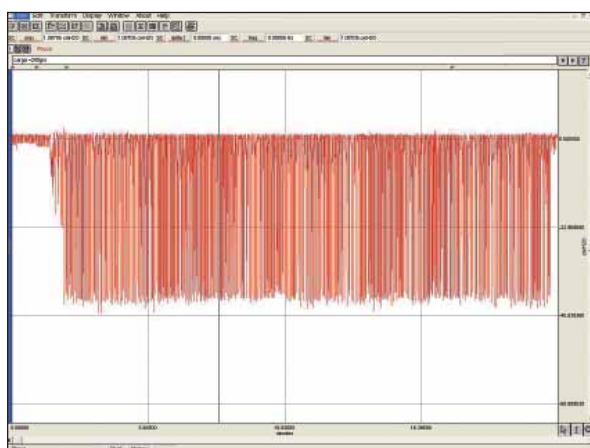


Figura 29. Registro de  $T_{lim}$  inspiratorio.

### Resistencia del grupo de músculos espiratorios

Recientemente nuestro grupo ha descrito un sistema de válvula de apertura umbral para aplicar cargas espiratorias (incrementales y constantes, según el caso) y evaluar así la resistencia de los músculos espiratorios en humanos (Orozco-Levi, M. *et al.*; 2001a; Ramirez-Sarmiento, A. *et al.*; 2002a). Algunas enfermedades como la EPOC pueden tener afectada la fuerza y resistencia de este grupo muscular. La potencial relevancia clínica de esta alteración es una menor eficacia de la tos y menor tolerancia ante las cargas adicionales del sistema como sucede durante las agudizaciones.

Algunos trabajos se están desarrollando sobre el campo del entrenamiento muscular espiratorio, y sus resultados demuestran que puede tener aplicabilidad práctica también en la terapia (Ramirez-Sarmiento, A. *et al.*; 2006).

### Interpretación de las pruebas de resistencia muscular respiratoria: la claudicación y sus criterios

Uno de los puntos más críticos para considerar válida una prueba de esfuerzo de los músculos respiratorios es el criterio de claudicación o finalización de la prueba. Involucra, por una parte, las experiencias del examinador y, por otra, la función muscular propiamente dicha y el grado de colaboración del paciente. En este sentido cabe anotar que las sensaciones que se precipitan durante la ejecución de la prueba son similares a la disnea que se genera durante las pruebas de esfuerzo general por cuanto incluye, además las variables perceptuales de disnea, esfuerzo muscular y fatiga. La integración de todos estos factores es lo que se expresará como variable resultado en las pruebas de resistencia. En nuestro laboratorio el final de la prueba lo determinan variables subjetivas (disnea limitante) y objetivas (evidencia de incapacidad para continuar abriendo la válvula durante 3 o más esfuerzos consecutivos). Uno de los puntos que representa una línea de investigación con interés clínico es la realización de estudios para establecer valores de referencia para las variables de resistencia muscular respiratoria en relación con la edad y género (masculino y femenino) de individuos sanos. De hecho, las variables de presión máxima tolerada y límite de tiempo se analizan convencionalmente en términos de valor absoluto por la ausencia de valores de referencia publicados. Sin embargo, es habitual que se hagan normalizaciones expresándolas como un porcentaje de la  $PI_{max}$  o del valor observado en sujetos sanos.



## Capítulo 4

# LOS MÚSCULOS PERIFÉRICOS EN INDIVIDUOS SANOS

### DEFINICIÓN DEL CONCEPTO DE “MÚSCULOS PERIFÉRICOS”

Cerca de 650 músculos estriados en los humanos constituyen el 40% del peso total del organismo (Testut, L. *et al.*; 1969a) y tienen como función contraerse para generar movimiento. Esto nos permite levantarnos, caminar, deglutir, respirar, hablar, mirar, gesticular, agarrar, mantener la postura y producir calor (Guyton, A.C. *et al.*; 2000). Para los objetivos de la presente memoria de Tesis Doctoral llamaremos **músculos periféricos** a un grupo heterogéneo de múltiples localizaciones diferentes a tronco y cuello, que incluye fundamentalmente los músculos localizados en las extremidades inferiores y superiores. A continuación se describirán tres músculos periféricos que se han evaluado frecuentemente por su fácil estudio funcional, además de la adecuada accesibilidad para la toma de biopsias, y realizar entonces estudios celulares y estructurales en diversas enfermedades que afectan el tejido muscular.

### DELTOIDES

Se llama así, a causa de su forma triangular ( $\Delta$ , letra del alfabeto griego) y abraza a manera de semicono hueco la articulación escapulohumeral. Es a la vez al más superficial y el más voluminoso de los músculos del hombro (Testut, L. *et al.*; 1969e) (ver figura 30).

Se inserta por arriba: 1º, en el tercio externo del borde anterior de la clavícula; 2º, en el borde externo del acromion; 3º en el borde

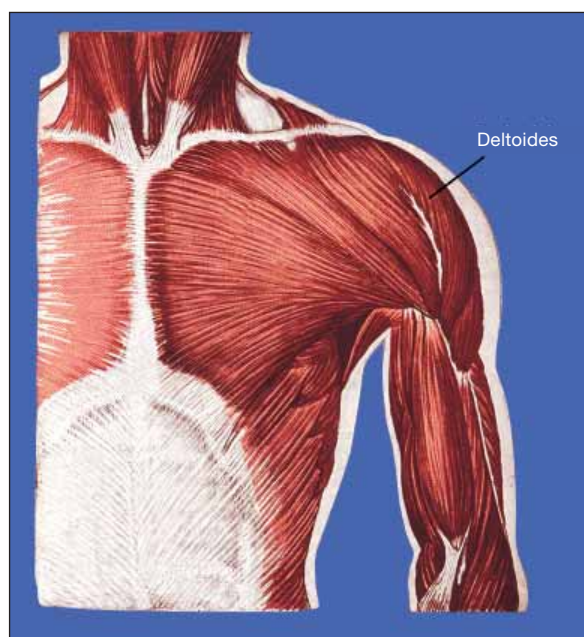


Figura 30. Vista anterior del músculo deltoides, modificado de Testut, L. *et al.*; 1969b.

posterior de la espina del omoplato en toda su extensión. Desde esta larga línea de inserciones superiores, los fascículos medios o acromiales se dirigen verticalmente hacia abajo; los fascículos anteriores o claviculares, oblicuamente hacia abajo, afuera y atrás; los fascículos posteriores, espinales o escapulares hacia abajo, afuera y adelante. Todos convergen hacia la impresión deltoidea del húmero y se insertan en ella por medio de un fuerte tendón en forma triangular (Testut, L. *et al.*; 1969e).

**Vascularización del deltoides.** Está dada por la **arteria circunfleja posterior**.

El trayecto de las primeras ramas de división es perpendicular a la dirección de los fascículos. Los ramúsculos que de ésta parten, penetran en el intersticio de los fascículos musculares y siguen un trayecto ora ascendente hacia las inserciones escapulares del músculo, ora descendente hacia la inserción humeral. Esta arteria siempre recibe un ramo deltoideo anterior de la arteria humeral y un ramo deltoideo posterior procedente de la arteria humeral profunda. Accesoriamente, la acromiotorácica y por excepción la circunfleja anterior envían algunos ramos deltoideos (Testut, L. *et al.*; 1969e).

**Inervación del deltoides.** Está dado por el **nervio circunflejo**, que es a su vez rama del plexo braquial.

El músculo **deltoides** tiene como **principal función** elevar o abducir el brazo. Además, a causa de su oblicuidad en sentido contrario, los fascículos anteriores dirigen el húmero hacia delante y los posteriores hacia atrás. Por la sola acción del deltoides, el brazo en su elevación no pasaría nunca de la horizontal, porque el húmero encuentra el vértice de la apófisis acromial que lo detiene. La elevación del húmero por encima de la posición horizontal resulta de un movimiento de báscula del omoplato en virtud de la cual el ángulo inferior se dirige hacia delante y el anterior hacia arriba. Sirve también para mantener fija la articulación del hombro, como el tríceps largo. Tomando como punto fijo el húmero, levanta el tronco (**acción de trepar**) (Testut, L. *et al.*; 1969e).

**Estructura celular del deltoides en individuos sanos.** En un estudio reciente de nuestro grupo, se ha demostrado que en individuos mayores sanos la proporción de fibras tipo II es ligeramente mayor que las de fibras tipo I ( $54 \pm 17$  vs  $48 \pm 17$ , respectivamente) (Hernandez, N. *et al.*; 2003). Sin embargo, no ha habido diferencias en el promedio del diámetro menor ( $50,7 \pm 8,2$  en las fibras tipo I y  $53,6 \pm 10$  en las fibras tipo II).

## **TIBIAL ANTERIOR**

Es el más interno de todos los músculos de la región anterior de la pierna; es un músculo voluminoso, prismático y triangular, que se extiende desde la extremidad superior de la tibia hasta el borde interno del pie (Testut, L. *et al.*; 1969b) (ver figura 31).

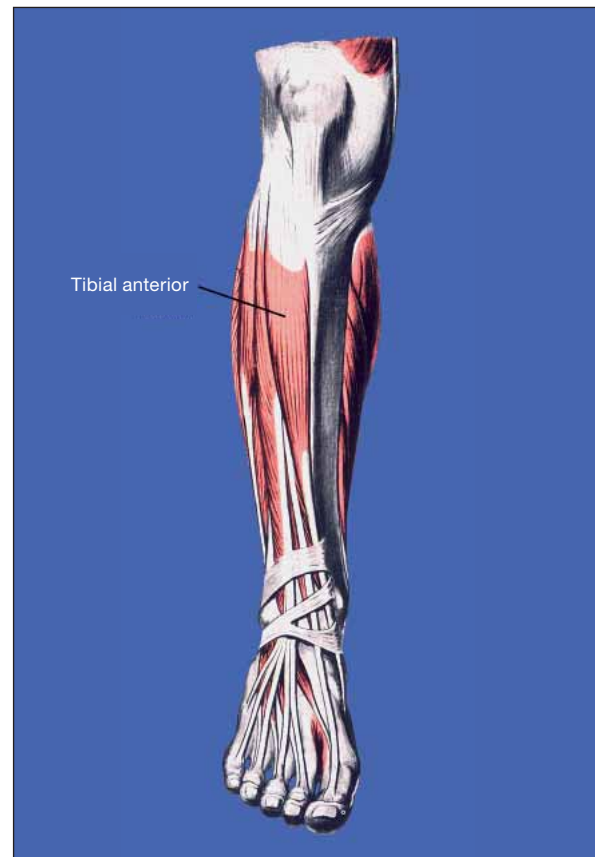


Figura 31. Músculo tibial anterior, modificado de Testut, L. *et al.*; 1969a.

Se inserta arriba: 1º en la tuberosidad anterior y en la tuberosidad externa de la tibia, principalmente en el tubérculo, por lo común muy voluminoso y que está situado entre ambas, el cual por este motivo lleva el nombre de **tubérculo tibial anterior**; 2º, en la cara externa de la tibia, en sus dos tercios superiores;

3°, en la parte interna del ligamento interóseo; 4°, en la cara profunda de la aponeurosis tibial que lo cubre; 5°, en el tabique fibroso que lo separa del extensor común de los dedos del pie. De estas numerosas superficies de inserción, los fascículos constitutivos del tibial anterior se dirigen verticalmente hacia abajo y se insertan en la parte inferior de la pierna, en un tendón resistente, el cual pasa por debajo del ligamento anular anterior del tarso y viene a insertarse a la vez en el primer cuneiforme y en la extremidad posterior del primer metatarsiano (Testut, L. *et al.*; 1969b).

**Vascularización del tibial anterior.** Está dada en la parte superior y profunda por los ramos que recibe de la **arteria recurrente tibial anterior**. El resto del músculo está irrigado por la **arteria tibial anterior**.

**Inervación del tibial anterior.** Está dado por el **nervio ciático poplíteo externo** y por el **nervio tibial anterior**.

El músculo **tibial anterior** tiene como **principal función**, al tomar por punto fijo a la tibia, imprimir tres órdenes de movimientos sobre el pie, como son: 1°, lo dobla enérgicamente sobre la tibia; 2°, lo aproxima a la línea media; 3°, le comunica un movimiento de rotación hacia adentro. Es, pues, a la vez **flexor, aductor y rotatorio hacia adentro del pie** (Testut, L. *et al.*; 1969b).

**Estructura celular del tibial anterior en individuos sanos.** Se ha demostrado en sujetos jóvenes, tanto varones como mujeres, que el porcentaje de fibras tipo I de este músculo es en promedio de un 77% (Jaworowski, A. *et al.*; 2002) con un rango entre 65 a 90%, según otros estudios (Henriksson-Larsen, K.B. *et al.*; 1983; Saltin, B. *et al.*; 1983).

## **MÚSCULO CUÁDRICEPS.**

Como el objetivo de la presente Tesis Doctoral es estudiar la disfunción muscular periféri-

ca se describe, sobre todo, un músculo antigravitacional que es necesario para la realización de actividades cotidianas como levantarse, caminar, etc.... Para esto hemos escogido el músculo de la región anterior del muslo, denominado **cuádriceps**, ya que éste ha sido objetivo de la inmensa mayoría de estudios publicados, tanto en pacientes con EPOC como en individuos con otras entidades tanto fisiológicas (crecimiento, envejecimiento) como patológicas.

Situado en el plano anterior del muslo (ver figura 32) el cuádriceps está constituido por cuatro fascículos musculares que, distintos en su origen superior, se unen hacia abajo para tomar en la rótula y en la tibia una inserción común.



Figura 32. Músculo cuádriceps, se aprecia el recto anterior, el vasto interno y externo, modificado de Testut, L. *et al.*; 1969b.

De estos cuatro fascículos, uno es el denominado **recto anterior**, que sube hasta la pelvis. Otros dos llamados **vastos**, en razón de sus dimensiones considerables, se detienen en el fémur. Se les distingue el uno del otro, según su situación, por las denominaciones de **vasto interno** y **vasto externo**. El cuarto fascículo, conocido con el nombre de **crural**, está situado por debajo de los dos vastos, tiene una forma aplanada y nace en el fémur. Como su nombre indica, está formado por cuatro cabezas que se unen en un tendón común (Testut, L. *et al.*; 1969f).

El **vasto interno** (ver figura 33), se origina en toda la región que se extiende desde la línea intertrocantérea, labio medial de la línea áspera y parte medial de la diáfisis femoral. Visualmente es la porción del cuádriceps que llega más distal en el muslo y que se correlaciona medialmente con el sartorio.

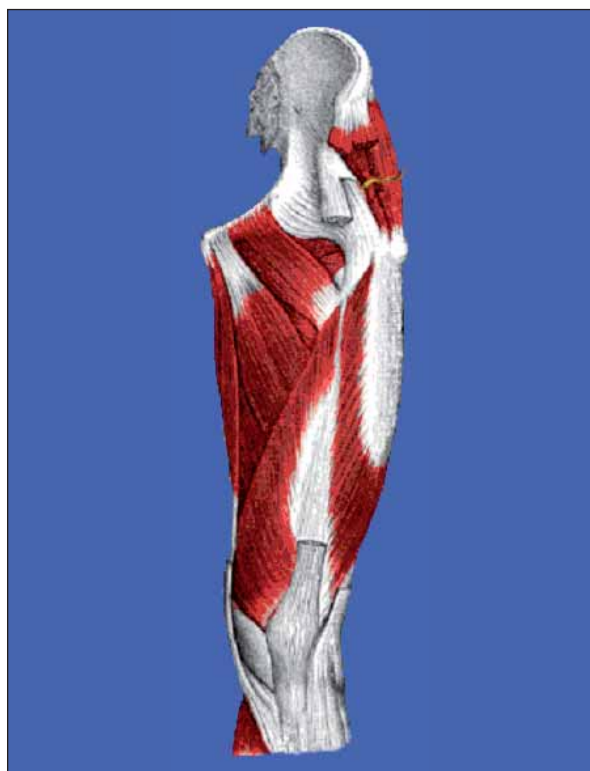


Figura 33. Vastos externo e interno del cuádriceps, modificado de Testut, L. *et al.*; 1969b.

El **vasto externo** (ver figura 33), se origina en la región que se extiende desde el trocánter mayor, labio lateral de la línea áspera y parte lateral de la diáfisis femoral.

Entre el **vasto interno** y el **vasto externo** se localiza el **crural**, que no se puede ver directamente porque queda profundo respecto al músculo **recto anterior**; se origina en las caras anterior y lateral de la diáfisis femoral.

El **recto anterior** es el único biarticular de las porciones que constituyen el cuádriceps. Se origina en la espina iliaca anterior inferior (cabeza directa) y en el surco supraacetabular mediante un tendón arqueado que se denomina **cabeza refleja**. Las fibras del recto femoral siguen caudalmente el eje del fémur.

Las cuatro cabezas del cuádriceps se insertan en la base y caras laterales de la rótula mediante el llamado **tendón del cuádriceps**. Algunas fibras de este tendón saltan la rótula sin tomar inserción (predominantemente las del recto anterior); otras acaban en la rótula y las de los vastos medial y lateral se entrecruzan. Desde el vértice de la rótula hasta la tuberosidad tibial se extiende el ligamento rotuliano, donde las fibras anteriormente citadas se insertan juntamente con algunas que llegan directas del recto femoral (las que no se insertaban en la rótula).

Desde los vastos interno y externo se extienden unas expansiones aponeuróticas que describen rectas a ambos lados de la rótula. Son los **retináculos rotulianos medial y lateral** que se insertan en los cóndilos respectivos de la tibia. Son difíciles de distinguir dentro del entrecruzamiento de aponeurosis de inserción y fascias en esta región anterior de la rodilla.

**Vascularización del cuádriceps.** Está dada por la **arteria del cuádriceps**, con excepción de la porción del vasto interno. El **recto anterior** tiene dos arterias principales (superior e inferior). La inferior ocupa una po-

sición axial (arteria axil del recto anterior) y, accesoriamente, recibe ramos de la circunfleja externa. El *vasto externo* recibe: 1º, en su parte superointerna, uno o varios ramos importantes de la circunfleja externa; 2º, en su parte inferior interna, un ramo de la arteria del cuádriceps y 3º, en su parte externa, ramos perforantes. El *vasto interno* posee tres arterias: 1ª, una superior procedente de la femoral superficial; 2ª, una mediana que nace debajo del conducto de Hunter y 3ª, una inferior que nace en el mismo conducto. La porción crural tiene dos vasos: uno externo, nacido de la arteria del cuádriceps, y otro emanado de la femoral profunda (Testut, L. *et al.*; 1969f).

**Inervación del cuádriceps.** Las cuatro porciones de este músculo reciben sus nervios (*nervios del cuádriceps*) del crural, que es a su vez una de las dos ramas terminales del plexo lumbar (Testut, L. *et al.*; 1969f).

El músculo **cuádriceps** tiene como *principal función extender la pierna sobre el muslo*, de ahí el nombre de *músculo extensor de la pierna*. Accesoriamente, y a causa de su inserción en la espina ilíaca, el recto anterior dobla el muslo sobre la pelvis, o viceversa, la pelvis sobre el muslo, según cual sea la palanca ósea que le sirve de punto fijo (Testut, L. *et al.*; 1969g).

**Estructura celular del cuádriceps en individuos sanos.** En la tabla 4 se resumen los diferentes estudios que demuestran el porcentaje de cada uno de los tipos de cadena pesada de miosina del cuádriceps de individuos sanos en diferentes grupos etáreos y bajo algunas circunstancias especiales. En conjunto todos estos estudios ponen en evidencia dos características particulares de las células musculares. Específicamente, estas características se refieren a la maleabilidad (adaptabilidad) de las fibras ante diferentes condiciones individuales y características propias del individuo. En segundo lugar la tabla pone en evidencia la coexistencia de características celulares y moleculares para ejercicios aeróbicos y anaerobios según en el caso.

La presente Tesis Doctoral está dirigida al estudio celular y funcional de los músculos periféricos (*cuádriceps*) y respiratorios (*intercostales externos*) en individuos de edad avanzada. En la tabla 5 se resumen aquellos estudios que han evaluado individuos mayores o ancianos. Como se puede evidenciar a partir de esto datos, la edad se asocia de forma directa con cambios en la proporción de fibras de tipo II e inversa con la proporción de fibras tipo I. Desde el punto de vista funcional es posible que estos cambios se relacionen con una menor capacidad aeróbica del músculo cuádriceps a medida que progresa la edad cronológica.

## **EVALUACIÓN FUNCIONAL DE LOS MÚSCULOS PERIFÉRICOS**

### **FUERZA MUSCULAR**

Como se ha descrito anteriormente, se define **fuerza** como la tensión máxima que genera un músculo o un grupo muscular (McArdle, W. *et al.*; 2000). Habitualmente la fuerza muscular se mide en kilogramos (kg). Está determinada principalmente por el tamaño o masa del músculo y, tanto para hombres como mujeres, es de unos 3 a 4 kg/cm<sup>2</sup> de su superficie de sección (Guyton, A.C. *et al.*; 2000). La **potencia** de la contracción muscular es distinta de la fuerza muscular porque es una medida de la cantidad total de trabajo que realiza un músculo en la unidad de tiempo. La potencia se determina no sólo mediante la valoración de la fuerza de contracción muscular, sino también por su distancia de contracción y por el número de veces que el músculo se contrae en cada minuto. La potencia muscular se mide generalmente en kilogramos-metro (kg-m) por minuto (Guyton, A.C. *et al.*; 2000).

La fuerza muscular se evalúa o valora mediante cuatro métodos habituales: tensiometría de cable, dinamometría, máximo de una repetición y determinaciones



**TABLA 4. DIFERENCIAS EN LA TIPIFICACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE MIOSINA EN EL CUÁDRICEPS**

AUTOR	POBLACIÓN SELECCIONADA	ISOFORMA DE CADENA PESADA DE MIOSINA				
		I (%)	I/IIA (%)	IIA (%)	IIA/IIIX (%)	IIIX (%)
(Klitgaard, H. <i>et al.</i> ; 1990b)	Jóvenes activos	50	8	26	12	4
(Klitgaard, H. <i>et al.</i> ; 1990a)	Jóvenes sedentarios	32	7	23	19	19
(Klitgaard, H. <i>et al.</i> ; 1990a)	Jóvenes activos	62	6	27	4	2
(Larsson, L. <i>et al.</i> ; 1996)	Jóvenes	40	2	43	12	3
(Biral, D. <i>et al.</i> ; 1988)	Normal	37	10	16	27	10
(Larsson, L. <i>et al.</i> ; 1996)	Jóvenes, antes de reposo en cama	36	0	40	17	7
	Jóvenes, después de reposo en cama	38	0	40	21	2
(Zhou, M.Y. <i>et al.</i> ; 1995)	Astronautas, antes del viaje espacial	49	5	24	18	4
	Astronautas, después del viaje espacial	39	8	34	18	2
(Klitgaard, H. <i>et al.</i> ; 1990a)	Deportistas de élite jóvenes (Fondistas)	31	36	30	3	0
(Iversen P.; 1992)	Pacientes con artritis de la rodilla (Pierna normal)	57	5	29	5	3
	Pacientes con artritis de la rodilla (Pierna enferma)	49	4	27	11	8
(Andersen, J.L. <i>et al.</i> ; 1994a)	Jugadores de élite de fútbol (fin de temporada)	62	1	28	8	1
	Jugadores de élite de fútbol (después de 3 meses sin entrenamiento)	63	3	22	12	0
	Jugadores de élite de fútbol (fin de temporada)	56	4	33	7	0
	Jugadores de élite de fútbol (después de 3 meses de entrenamiento de fuerza)	59	3	30	8	0
Andersen, J.L. <i>et al.</i> ; 1994b)	Velocistas (después de 4 semanas sin entrenamiento)	52	0	35	13	0
	Velocistas (después de 3 meses de entrenamiento de fuerza y carreras)	41	2	52	5	0
(Andersen, J.L. <i>et al.</i> ; 1996)	Individuos con lesión medular (antes de entrenamiento con EEF)	1	0	21	41	37
	Individuos con lesión medular (después de 6 meses de entrenamiento con EEF)	1	2	44	51	3
	Individuos con lesión medular (después de 12 meses de entrenamiento con EEF)	0	2	91	5	2
(Klitgaard, H. <i>et al.</i> ; 1990b)	Ancianos	33	20	12	33	2
(Larsson, L. <i>et al.</i> ; 1997)	Ancianos	56	1	26	10	7
(Larsson, L. <i>et al.</i> ; 1997)	Ancianos, muy activos	22	6	47	12	13
(Andersen, J.L. <i>et al.</i> ; 1999)	Muy ancianos	20	29	27	22	< 1

EEF: Estimulación eléctrica funcional. Modificado de (Andersen, J.L. *et al.*; 1999)

**TABLA 5. TIPIFICACIÓN DE FIBRAS MUSCULARES EN INDIVIDUOS MAYORES**

AUTOR	POBLACIÓN	FIBRAS I	FIBRAS IIA	FIBRAS IIX
(Larsson, L. <i>et al.</i> ; 1997)	Sanos, caucásicos del norte de Europa	56 ± 12	26 ± 11	7 ± 5
(Satta, A. <i>et al.</i> ; 1997)	Sanos, caucásicos del mediterráneo	44 ± 16	46 ± 9	7 ± 12
(Whittom, F. <i>et al.</i> ; 1998)	Sanos, caucásicos estadounidenses	58 ± 16	32 ± 15	5 ± 5
(Maltais, F. <i>et al.</i> ; 1999)	Sanos, caucásicos estadounidenses	41 ± 9	39 ± 9	20 ± 9

Los datos son mostrados como media ± DS; ND: No Determinado.

electromecánicas o isocinéticas asistidas por ordenador (McArdle, W. *et al.*; 2000).

La **tensiometría de cable** mide la fuerza muscular estática durante una contracción muscular isométrica, (ver figura 34). Al aumentar la fuerza aplicada sobre un cable se deprime un elevador sobre el que pasa dicho cable. Ésto desvía la aguja indicadora y señala el valor de la fuerza de la persona (Grund, A. *et al.*; 2001; McArdle, W. *et al.*; 1991).

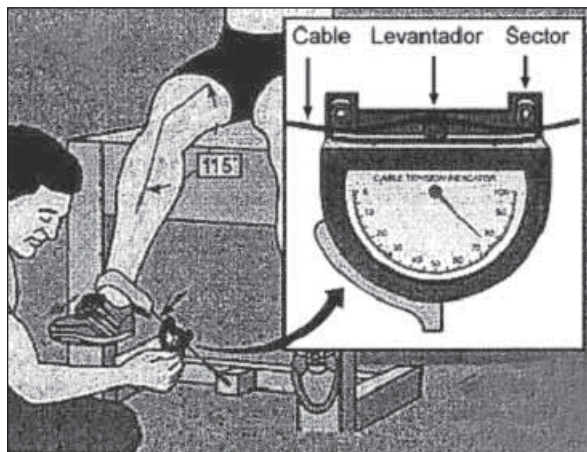


Figura 34. Tensiómetro de cable.

La **tensiometría** de cable aísla el músculo en un ángulo articular específico. Permite determinar la fuerza tras una intervención (p.e. antes y después del entrenamiento y la rehabilitación). Esta valoración de la fuerza proporciona otra ventaja, dado que puede aplicarse

en diferentes puntos de la fase del movimiento. Claramente valora la fuerza (o la debilidad) de determinados músculos con diversos ángulos articulares a lo largo del rango de movimiento articular (**ROM**, sigla en inglés). Esto no puede hacerse con las pruebas estándares, como por ejemplo el levantamiento de pesas.

La **dinamometría** se utiliza para evaluar la fuerza estática. Los dinamómetros son dispositivos que operan de acuerdo con el principio de la compresión. La aplicación de una fuerza externa al dinamómetro comprime un muelle de acero y mueve una aguja de registro (ver figura 35). Si se conoce la fuerza necesaria para



Figura 35. Dinamómetro.

desplazar la aguja a una distancia determinada, se puede averiguar la fuerza externa “estática” que se ha aplicado al dinamómetro (Hillman, T.E. *et al.*; 2005; Hornby, S.T. *et al.*; 2005).

La **técnica de una repetición máxima** (1-RM) es un método dinámico para valorar la fuerza muscular (Pincivero, D.M. *et al.*; 2003). Para analizar por **1-RM** un único músculo o un grupo de músculos, el peso inicial debe ser submáximo (cercano a la capacidad máxima de levantamiento, aunque por debajo). Dependiendo del grupo de músculos, el aumento de peso normalmente va de 1 a 5 kg. La maniobra de **1-RM** necesita acciones musculares concéntricas y excéntricas, aunque sólo evalúa la **fase concéntrica** de la acción. La figura 36 muestra dos métodos submáximos adicionales para evaluar la capacidad generadora de fuerza y potencia de un músculo. En estas pruebas, la mayor cantidad de peso que se levanta cinco o diez veces constituye la **RM**. El procedimiento de medida en estos casos valora **5-RM** o **10-RM**. Los métodos **5-RM** y **10-RM** son marcadores adecuados de fuerza muscular, especialmente cuando se analiza en niños y ancianos, en los que puede estar contraindicado un levantamiento máximo.

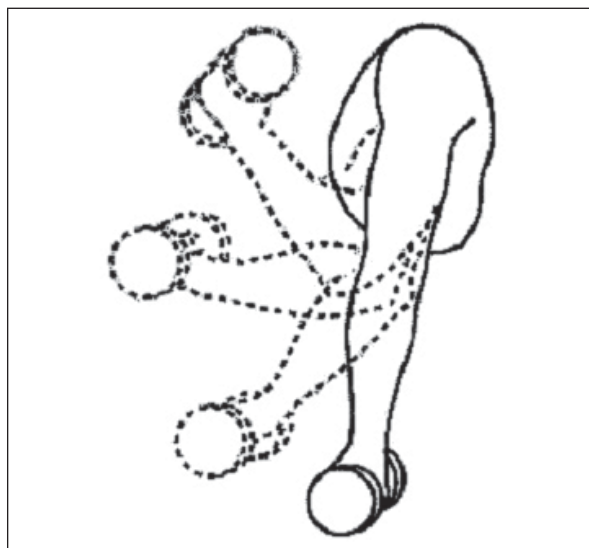


Figura 36. Técnica de 1-RM.

Las **determinaciones electromecánicas e isocinéticas asistidas por ordenador** se han desarrollado gracias a la tecnología de los microprocesadores integrada con la máquina que cuantifica la fuerza y la potencia muscular durante diversos movimientos. La instrumentación moderna mide la fuerza, la aceleración y la velocidad de los segmentos corporales con varios patrones de movimiento. Las plataformas de fuerza pueden por ejemplo medir la aplicación externa de fuerza muscular por las extremidades durante el salto. Otros dispositivos electromecánicos miden la fuerza generada durante las fases del movimiento durante la práctica del ciclismo, el remo, el *press* de banco tanto en decúbito supino como en sedestación, la prensa de piernas desde la bipedestación y los ejercicios de tronco, brazos y piernas.

Un **dinamómetro isocinético** es un instrumento electromecánico con un mecanismo de control de la velocidad que se acelera hasta una velocidad preestablecida, constante con la fuerza aplicada, con independencia de la fuerza ejercida sobre el brazo en movimiento (ver figura 37). La fuerza máxima (o cualquier porcentaje de esfuerzo máximo) puede aplicarse durante todas las fases del movimiento a una velocidad constante. Una célula de carga en el interior del dinamómetro registra continuamente la fuerza aplicada para calcular la fuerza media, la potencia y el trabajo total durante el **ROM** (Falkel, J.; 1978; Gozlan, G. *et al.*; 2005; Li, R.C. *et al.*; 1996).

La unión de la tecnología de los ordenadores y los dispositivos mecánicos proporciona datos valiosos para evaluar la función muscular y prescribir el ejercicio adecuado. Muchos consideran aún la **1-RM** como el mejor método para evaluar la fuerza muscular global y rechazan los avances tecnológicos que valoran la fuerza mediante el uso de ordenadores. El argumento a favor de la metodología isocinética es que la dinámica de la fuerza muscular implica considerablemente, más que un resultado final, la de un levantamiento **1-RM**, **5-RM** o **10-RM**. Incluso si dos personas tienen la mis-

ma puntuación **1-RM**, las curvas fuerza-tiempo pueden ser bastante diferentes. Las diferencias de la dinámica de la fuerza (p.e. el tiempo para alcanzar el pico de tensión o el ritmo de adquisición de la fuerza) reflejan diferencias de la interacción de los factores neuromusculares. Las cibertecnologías más nuevas valoran muchos componentes de la dinámica muscular y no sólo la carga máxima que una persona puede levantar en banco o generar por medio de las flexiones.

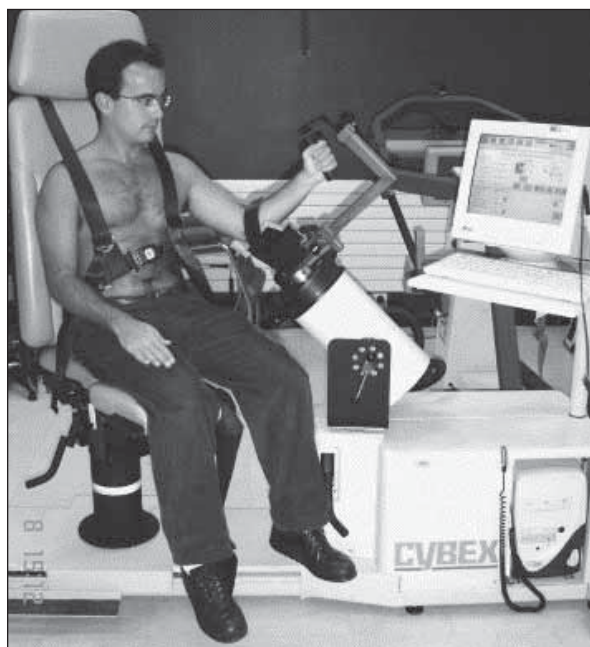


Figura 37. Dinamómetro isocinético.

### Evaluación de la fuerza del cuádriceps

La fuerza producida mediante contracciones isométricas del músculo cuádriceps se ha estudiado durante contracciones voluntarias máximas, encontrándose que es directamente proporcional al peso de los individuos (Edwards, R.H. *et al.*; 1977). Al utilizar el dinamómetro isocinético **Cybex II**<sup>®</sup> se ha demostrado que en niños prepúberes el promedio de la fuerza máxima de **torque** del cuádriceps

(medida en pies-libras a 60 grados/segundo) es igual al 70% de la masa magra (**torque** o **momento de la fuerza**; se define como la propiedad de la fuerza que hace girar un cuerpo, depende de la fuerza aplicada y de la distancia hasta el centro de rotación donde se aplica la fuerza). En sujetos postpúberes el **torque** promedio del pico del cuádriceps igualó el 80% de la masa magra en mujeres y el 90% en hombres (Tabin, G.C. *et al.*; 1985).

La fuerza máxima del músculo cuádriceps no disminuye significativamente entre los 20 y los 50 años de edad aunque después se reduce significativamente (alrededor de 15% por década) hasta llegar aproximadamente a un 50% del inicial, alrededor de los 70 años de edad (Fisher, N.M. *et al.*; 1990). Esta gran reducción de la fuerza máxima de un músculo grande e importante tiene repercusiones funcionales en acciones como el levantarse de una silla, subir escaleras, caminar y eventualmente mantener la bipedestación.

### RESISTENCIA MUSCULAR

Como ya se ha visto anteriormente, se define **resistencia muscular** como la capacidad de mantener una fuerza máxima o submáxima durante un tiempo determinado. Cuando hablamos de ejercicios de resistencia nos referimos a un período de tiempo que oscila normalmente entre ~30 minutos y varias horas (Coyle, E.F. *et al.*; 1983; Coyle, E.F. *et al.*; 1988; Coyle, E.F.; 1999; Farrell, P.A. *et al.*; 1979; Hagberg, J.M. *et al.*; 1983). La resistencia suele valorarse por el número máximo de repeticiones obtenidas con un ejercicio o el tiempo de tolerancia ante una carga (tiempo de aguante o tiempo límite) submáxima (resistencia “aerobia”) que un sujeto es capaz de realizar (Guyton, A.C. *et al.*; 2000). La resistencia depende, hasta cierto punto, del aporte de elementos nutritivos al músculo (excluyendo el oxígeno) y de la cantidad de glucógeno depositado en el músculo antes de realizar el ejercicio.

La claudicación incluye la interacción de varios factores, entre los cuales están los perceptuales (neuropsicológicos), centrales (neurológicos o nerviosos) y los periféricos o locales (musculares propiamente dichos). Como se resume en la tabla 6.

La fatiga muscular se debe diferenciar de la claudicación. Ésta última ha sido definida como la inhabilidad para mantener las contracciones y/o ejercicio a la fuerza y/o intensidad deseada (Vollestad, N.K. *et al.*; 1988). La resistencia se examina mediante la evaluación del tiempo de aguante o tiempo límite. Este acercamiento se basa en la presunción de que hay una asociación entre la disminución de la capacidad en la generación de la fuerza máxima y el tiempo de claudicación. Sin embargo, varios estudios muestran que, la relación entre estos dos parámetros puede variar considerablemente. Por ejemplo, durante las contracciones isométricas submáximas repetitivas del cuádriceps, los sujetos con igual tiempo de claudicación y fatiga central inapreciable mostraron una reducción en la contracción máxima voluntaria, que iba entre el 35 y el 70% (Vollestad, N.K. *et al.*; 1988). Estas observaciones sugieren que hay diferentes mecanismos detrás del desarrollo de la fatiga y claudicación. Por tanto, el tiempo de aguante o tiempo límite y los cambios en la capacidad máxima de generar fuerza o potencia claramente proporcionan información sobre diferentes procesos provocados por el ejercicio.

El umbral para la fatiga es aquel nivel de ejercicio que no puede ser mantenido indefinidamente. Esto último puede considerarse equivalente a un mínimo de 45 minutos (Bigland-Ritchie, B.; 1984). Es interesante señalar que las fuerzas por debajo de un 15% de la contracción voluntaria máxima pueden ser mantenidas indefinidamente sin síntomas de fatiga (Rohmert, W.; 1960). Para mayores niveles de fuerza, el tiempo de resistencia o aguante disminuye exponencialmente a medida que se incrementa la fuerza. Esta relación podía aplicarse tanto para contracciones voluntarias máximas como submáximas en un amplio abanico de músculos de las extremidades en los seres humanos (Rohmert, W.; 1960). Todos demostraron un umbral de fatiga alrededor del 15% de la contracción voluntaria máxima.

Cuando un músculo se contrae se aumenta la presión intramuscular; si este incremento supera un nivel crítico, causa una progresiva restricción del flujo sanguíneo por colapso capilar y, por tanto, limita el suministro de energía. Para las contracciones isométricas sostenidas, el umbral de la fatiga generalmente se corresponde con el comienzo de la limitación al flujo sanguíneo. Los tiempos de resistencia más largos asociados con fatiga debido a contracciones intermitentes a todos los niveles de fuerza, claramente resultan de un flujo no restringido y una hiperemia reactiva, que parcialmente vuelve a proporcionar un suministro de energía durante el período de relajación (Humphreys, P.W. *et al.*; 1963). Por tanto, el tiempo

**TABLA 6. DEFINICIONES DE FATIGA**

CONCEPTO	DEFINICIÓN
Fatiga muscular	Reducción en la capacidad de generar fuerza o potencia, inducida por el ejercicio.
Fatiga central	Reducción de la fuerza en una contracción voluntaria máxima, inducida por el ejercicio que no se acompaña por la misma reducción en la fuerza evocable máxima.
Fatiga perceptual	Reducción de la fuerza debido a la percepción de síntomas incapacitantes como dolor.

Modificado de (Vollestad, N.K.; 1997)

de resistencia depende de cada carga particular empleada (Bellemare, F. *et al.*; 1982) y del tiempo de contracción.

Las pruebas para determinar la resistencia del músculo cuádriceps consisten generalmente en la repetición de la extensión de la pierna contra una carga pre-establecida. En estos

ejercicios se valorará el tiempo de aguante o tiempo límite que se medirá en segundos o minutos. Esta prueba se realiza en bancos de ejercicios donde se fija el tronco y el muslo, para ejecutar el movimiento de extensión de la pierna, o también puede realizarse mediante un dinamómetro isocinético (Westblad, P. *et al.*; 1996).



## Capítulo 5

# LOS MÚSCULOS ESQUELÉTICOS EN ENFERMOS CON EPOC

### RELACIÓN ENTRE LA EPOC Y LOS MÚSCULOS RESPIRATORIOS

#### Cambios funcionales

La función del diafragma y de los demás músculos respiratorios puede verse afectada por diversas patologías, tanto en su capacidad para generar presión (fuerza) como en su resistencia, o en ambas. La fatiga del diafragma no ocurre en individuos sanos, salvo en condiciones especiales (p.e. carrera de maratón o ciclismo, estimulación frénica externa o sobrecarga ventilatoria). Sin embargo, está bien documentado que la fatiga diafragmática puede aparecer en **1)** enfermos con EPOC o patologías neuromusculares (Derenne, J.P. *et al.*; 1978a; Derenne, J.P. *et al.*; 1978b; Derenne, J.P. *et al.*; 1978c; Murciano, D. *et al.*; 1984) y participa la insuficiencia ventilatoria (Macklem, P.T. *et al.*; 1977) y **2)** en el proceso de destete de la ventilación mecánica (Cohen, C.A. *et al.*; 1982).

Durante algún tiempo se postuló la existencia de la llamada “fatiga crónica” de contracción para explicar la hipoventilación persistente en pacientes con enfermedades neuromusculares o EPOC, así como su mejoría con el reposo o la ventilación mecánica (National Heart Lung and Blood Institute.; 2002). No obstante, varios estudios recientes hacen dudar de su existencia pues, **1)** la disfunción muscular puede ser resultado de daño muscular irreversible o lentamente reversible; **2)** la ventilación mecánica nocturna de pacientes neuromusculares o enfermedades de la caja torácica mejora el intercambio de gases sin aumentar la fuerza muscular (Hill, N.S. *et al.*; 1992), y **3)** los pacientes

con EPOC preservan la capacidad de generar fuerza con su diafragma aún en presencia de hiperinsuflación severa. Todo ello sugiere que la anteriormente mencionada fatiga crónica del diafragma en realidad no exista, al menos en este tipo de enfermos (Broquetas, J.M.; 1992). La hipoventilación respondería más a una disminución refleja del estímulo respiratorio con el objetivo de evitar la fatiga diafragmática, el daño muscular y el fracaso ventilatorio (Begin, P. *et al.*; 1991). Sin embargo, otros estudios han evidenciado que la resistencia de los músculos respiratorios está disminuida en pacientes con apneas obstructivas durante el sueño (Aran, X.; 1992; Aran, X. *et al.*; 1995).

Por otra parte, en los pacientes con EPOC la fuerza y resistencia del diafragma se ven afectadas de forma predominante por los cambios en la configuración del sistema respiratorio y sus consecuencias mecánicas. De hecho, cuando la hiperinsuflación pulmonar es grave el diafragma se desplaza hacia abajo y se aplana. Esto origina dos fenómenos: en primer lugar, la zona de aposición disminuye, y pasa la configuración de un sistema *en serie* a otro *en paralelo*; además, atendiendo a la ley de Laplace (presión = tensión/radio de curvatura), la capacidad de generar presión ante una misma tensión decrece. Estos fenómenos justifican en gran medida la disminución de la presión inspiratoria máxima ( $PI_{max}$ ) y presión transdiafragmática ( $Pdi_{max}$ ) en pacientes con EPOC (Epstein, S.K.; 1994). Sin embargo, estos enfermos poseen una fuerza en el diafragma igual o mayor que la observada en individuos sanos a volumen pulmonar equivalente (Similowski, T. *et al.*; 1991).



## Cambios estructurales

Los músculos respiratorios de los pacientes con EPOC manifiestan una serie de alteraciones y/o adaptaciones estructurales, debido tanto a factores locales como sistémicos. Dentro de los primeros tenemos la obstrucción bronquial y el atrapamiento aéreo (Similowski, T. *et al.*; 1991), mientras que entre los factores sistémicos podemos citar la hipoxia, la hiper-capnia, la presencia de comorbilidades, el estado nutricional, el uso de medicamentos que deterioran la función muscular, la inflamación y el estrés oxidativo (para revisión ver [American Thoracic Society *et al.*; 1999]). A continuación detallaremos los cambios presentes en los músculos respiratorios.

### Cambios estructurales del músculo diafragma

Al menos ocho estudios coinciden en describir que la presencia de EPOC se asocia con atrofia (disminución del tamaño de las fibras) en el músculo diafragma (Arora, N.S. *et al.*; 1982; Hards, J.M. *et al.*; 1990; Hughes, R.L. *et al.*; 1983; Sanchez, J. *et al.*; 1982; Sanchez, J. *et al.*; 1985; Steele, R.H. *et al.*; 1973; Thurlbeck, W.M.; 1978). Por el contrario, sólo un estudio ha demostrado que existe hipertrofia en este músculo (Ishikawa, S. *et al.*; 1973). Esta controversia se complementa con nuestros propios estudios (Orozco-Levi, M. *et al.*; 2000; Sauleda, J. *et al.*; 1998) que no demuestran cambios significativos en el tamaño de las fibras del diafragma en estos pacientes. Es interesante resaltar que nuestros trabajos han puesto de manifiesto que el tamaño de las fibras del diafragma está preservado inclusive en pacientes que muestran los estadios más avanzados de la enfermedad (Orozco-Levi M *et al.*; 1996a; Orozco-Levi, M. *et al.*; 1997a). Probablemente las diferencias entre los diferentes autores tengan que ver con los criterios de selección de los individuos estudiados, que en nuestro caso han sido siempre rigurosos en el sentido de excluir la comorbilidad relevante. Presumiblemente, la atrofia descrita por otros

autores expresa que el contenido de proteínas contráctiles del diafragma (miosina y actina) sea menor. Esta alteración estructural condicionaría que la tensión (y por consiguiente la fuerza) que el músculo es capaz de generar sea menor. Sin embargo, podría también expresarse por un cambio adaptativo para facilitar el transporte difusivo del oxígeno desde los capilares a la maquinaria mitocondrial. (Booth, F.W. *et al.*; 1991; Desplanches, D. *et al.*; 1996).

Por otra parte, existen dos hallazgos adicionales, uno funcional y otro estructural, que nos permiten refutar que la pérdida de fuerza sea intrínseca del propio diafragma. El primero se refiere a una evidencia contradictoria a lo convencionalmente aceptado: la fuerza del diafragma está preservada o puede ser incluso mayor que la de individuos sanos si se comparan ambos grupos a volúmenes pulmonares equivalentes (Similowski, T. *et al.*; 1991). Este hallazgo puede estar relacionado con un trabajo de nuestro grupo, de índole estructural, en el que se pudo demostrar que existen cambios adaptativos en la estructura del diafragma a nivel de su unidad funcional contráctil: la sarcómera (Orozco-Levi, M. *et al.*; 1999). En concreto, hemos evidenciado que la sarcómera del diafragma de pacientes con EPOC es de menor longitud que la de individuos sanos. Este cambio permite que el músculo preserve su capacidad de generar tensión a pesar de que su longitud total sea menor. Otro aspecto se refiere a la capacidad metabólica del diafragma. Nosotros hemos demostrado que la capacidad aeróbica del músculo estaría favorecida, dado que el contenido de mitocondrias (Farkas, G.A. *et al.*; 1982; Lloreta, J. *et al.*; 1996) y de capilares (Orozco-Levi, M. *et al.*; 1996c; Orozco-Levi, M. *et al.*; 1996b) está incrementado. Esto correlaciona con los incrementos en las enzimas aeróbicas que otros grupos han podido describir en biopsias de diafragma de pacientes con EPOC (Hughes, R.L. *et al.*; 1983). Además, tenemos el carácter de modulación de la expresión molecular de las isoformas de miosina (*switching*) en el diafragma de pacientes con EPOC grave. Se ha demostrado que las fibras del diafragma de los pacientes con EPOC expresan mayor contenido

de miosina tipo I (aquella con mayor capacidad aeróbica) que los individuos sanos (Levine, S. *et al.*; 1997; Orozco-Levi, M. *et al.*; 1999; Sauleda, J. *et al.*; 1998). Esto favorecería la capacidad de resistencia muscular.

Todo lo anterior permite postular que el diafragma de pacientes con EPOC es capaz de expresar cambios adaptativos a nivel estructural para afrontar las nuevas situaciones, tanto mecánica como metabólica, que la presencia de esta enfermedad conlleva. Aunque la historia natural de la EPOC no está definida con precisión, estos eventos hacen replantear las expectativas de intervención terapéutica sobre los músculos inspiratorios en pacientes con fracaso ventilatorio crónico.

### Cambios estructurales del músculo intercostal externo

Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que las fibras de los músculos intercostales externos tienen un diámetro similar en los pacientes con EPOC y en los individuos sanos (Sauleda, J. *et al.*; 1998). Sin embargo, existen cambios moleculares muy relevantes en la expresión de proteínas contráctiles. Específicamente se ha demostrado que la expresión de miosina tipo II se incrementa en la EPOC de forma proporcional a su gravedad (Gea, J.G.; 1997). Esto sugiere que la modalidad y la frecuencia de activación de este grupo de músculos son totalmente diferentes a las del diafragma. Nosotros suponemos que esto se fundamenta en un reclutamiento intermitente y de alta intensidad, probablemente asociado a la tos o a incrementos ventilatorios durante el ejercicio en actividades cotidianas (Orozco-Levi, M. *et al.*; 1997b).

### Cambios funcionales y estructurales de los músculos espiratorios

Como ya se ha dicho anteriormente, el proceso de espiración en pacientes con EPOC es

un evento activo, incluso en reposo (Ninane, V. *et al.*; 1992; Ninane, V.; 1997) aunque su nivel de reclutamiento aumenta durante el ejercicio (Dodd, D.S. *et al.*; 1984) o cuando hay un incremento en la gravedad de la obstrucción de la vía aérea (Gorini, M. *et al.*; 1997; O'Donnell, D.E. *et al.*; 1987). Pese a que existen algunas discrepancias entre los diferentes estudios, más del 50% de los pacientes con EPOC muestran una disminución de la fuerza de los músculos espiratorios (Rochester, D.F. *et al.*; 1985). Estudios recientes de nuestro grupo demuestran que la resistencia de los músculos respiratorios también se encuentra disminuida en los pacientes con EPOC (Ramirez-Sarmiento, A. *et al.*; 2002a).

Hay escasos datos publicados acerca de los cambios estructurales de los músculos espiratorios. Nuestro grupo ha demostrado que las fibras son más pequeñas y el porcentaje de fibras tipo II se encuentra aumentado en el **músculo oblicuo externo** de los pacientes con EPOC grave (Barreiro, E. *et al.*; 1999; Hernandez, N. *et al.*; 2001).

## **RELACIONES ENTRE LA EPOC Y LOS MÚSCULOS PERIFÉRICOS**

### Cambios funcionales

Son varios los estudios que han puesto de manifiesto cambios funcionales importantes en los músculos periféricos de las extremidades inferiores. Se ha considerado que estos grupos musculares podrían ser los más determinantes en la limitación funcional ante el esfuerzo en estos pacientes.

En 1992 por primera vez se comenzó a sugerir el concepto de disfunción muscular (Killian, K.J. *et al.*; 1992) y que esto jugaba un papel clínicamente relevante. Este término se aplicó al observar que un número relativamente alto de los pacientes con EPOC (más del 40%), presentaban una menor tolerancia al ejercicio por síntomas en extremidades inferiores (American Thoracic Society *et al.*; 1999).

La disminución de la tolerancia al esfuerzo es un problema común en los pacientes con EPOC. Varios estudios han indicado que la intolerancia al ejercicio en estos pacientes no depende exclusivamente de la limitación ventilatoria ni de las anormalidades del intercambio gaseoso, sino que incluye factores musculares periféricos (Montes de Oca, M. *et al.*; 1996; Montes de Oca, M. *et al.*; 2000).

Otros grupos musculares también se encuentran afectados en la EPOC, como los músculos de la cintura escapular y de los brazos, que tienen especial relevancia en las actividades de la vida diaria y algunos pacientes acusan síntomas importantes en relación con estas actividades (Tangri, S. *et al.*; 1973). Esto se puede atribuir a varios factores. **Primero**, los músculos de la cintura escapular también participan en la ventilación, por lo que el ejercicio de brazos precipita asincronía respiratoria en los pacientes con EPOC (Celli, B.R. *et al.*; 1986). **Segundo**, ciertas posiciones de los brazos permiten incrementar la ventilación (Banzett, R.B. *et al.*; 1988). **Tercero**, el ejercicio de los brazos es menos eficiente (es decir, el gesto metabólico es mayor) que el de las piernas al comparar un mismo nivel de trabajo (Casaburi, R. *et al.*; 1992). Presumiblemente esto se asocia a un metabolismo anaeróbico más precoz en los brazos y al gasto metabólico de los músculos que participan en la fijación del tronco. Y **cuarto**, hay diferencias importantes en el grado de disfunción muscular al comparar piernas y brazos. Así, la fuerza del cuádriceps está más disminuida que la de las manos (Bernard, S. *et al.*; 1998; Gosselink R *et al.*; 1998; Gosselink, R. *et al.*; 1996).

Existen evidencias que, desde el punto de vista sistémico, permiten referirse a una disfunción muscular periférica. Se ha demostrado que la distancia que los pacientes con EPOC pueden recorrer en una prueba de marcha se correlaciona con el índice creatinina-talla, especialmente en los pacientes con bajo peso. Esto denota que la masa corporal libre de grasa limita la capacidad de ejercicio (Schols, A.M. *et*

*al.*; 1991a). Más recientemente se ha encontrado que la disminución de la masa corporal libre de grasa se asocia a una disminución en la capacidad de consumo máximo de oxígeno (Baarends, E.M. *et al.*; 1997). Finalmente, se ha demostrado que la Deshidrogenasa láctica (LDH, en inglés) sérica se incrementa en los pacientes con EPOC que padecen una miopatía esquelética esteroidea (Decramer, M. *et al.*; 1996).

### Alteración de la fuerza de los músculos periféricos

Desde el punto de vista específico, estudios descriptivos demuestran consistentemente que la fuerza de las piernas está disminuida en los pacientes con EPOC (Decramer, M. *et al.*; 1994; Gosselink, R. *et al.*; 1996; Hamilton, A.L. *et al.*; 1995). Más aún, se ha encontrado que tiene una asociación directa con la distancia recorrida en la prueba de marcha de 6 minutos, la gravedad de los síntomas durante una prueba de esfuerzo incremental (Hamilton, A.L. *et al.*; 1995) y la capacidad máxima de consumo de oxígeno (Gosselink, R. *et al.*; 1996; Hamilton, A.L. *et al.*; 1995). En la misma línea, existen estudios intervencionistas que demuestran que el entrenamiento de la fuerza de las piernas se asocia a una mejoría, tanto en la capacidad de ejercicio (Troosters T *et al.*; 1996) como en la calidad de vida de estos pacientes (Simpson, K. *et al.*; 1992). Recientemente se ha publicado que la fuerza de los músculos de las manos está disminuida en los pacientes con EPOC (Gosselink, R. *et al.*; 2000). Este último modelo tiene como ventaja que obviaría, aparentemente, el efecto del decondicionamiento por sedentarismo que puede actuar sobre los músculos de las piernas. *A priori* es posible proponer que las actividades con las manos serán similares en los pacientes y en una población sedentaria sana. Resulta interesante que la disfunción muscular de las manos se asocia no sólo a la presencia sino también a la gravedad de la EPOC (Orozco-Levi, M. *et al.*; 1998). Esta asociación resulta difícil de justificar si no se postula la existencia de un factor con poten-

cial efecto sistémico como una de las causas de esta disfunción (Orozco-Levi, M. *et al.*; 1998).

### Alteración de la resistencia de músculos periféricos

Son muy pocos los estudios funcionales que han evaluado directamente la resistencia de los músculos periféricos en los pacientes con EPOC y sus probables implicaciones funcionales. Sin embargo, existen evidencias indirectas de que puede estar seriamente deteriorada en estos pacientes y participar en la limitación al esfuerzo físico. Desde el punto de vista indirecto, algunos trabajos han evaluado la resistencia de los músculos periféricos y asumen que puede estar representada por la concentración de las enzimas de la cadena respiratoria intracelular o por los catabolitos musculares durante el ejercicio. Recientemente, se ha demostrado que los pacientes con EPOC desarrollan de forma precoz un metabolismo muscular anaeróbico durante el ejercicio, lo cual contribuye a su limitación ante el esfuerzo incremental (Casaburi, R. *et al.*; 1991; Maltais, F. *et al.*; 1996b; Patessio, A. *et al.*; 1993).

Otra evidencia es que la capacidad de consumo de oxígeno se encuentra reducida en los pacientes candidatos a un trasplante pulmonar, en asociación directa con alteraciones en el metabolismo muscular oxidativo (Evans, A.B. *et al.*; 1997). Esto se correlaciona con la reciente descripción de Maltais en cuanto existe una asociación directa entre la concentración de enzimas aeróbicas en las piernas y la capacidad de consumo de oxígeno (Maltais, F. *et al.*; 1996b). También se ha valorado el impacto de la resistencia muscular periférica en la limitación al ejercicio físico mediante el estudio de los cambios metabólicos tras el entrenamiento. Así, por ejemplo, el entrenamiento muscular incrementa las enzimas oxidativas del cuádriceps y la capacidad de ejercicio, aunque la mejoría de estos dos parámetros no se correlaciona significativamente (Maltais, F. *et al.*; 1996a). Otra útil alternativa de evalua-

ción ha sido el análisis de la contribución relativa del metabolismo aeróbico y anaeróbico durante las pruebas de esfuerzo a carga submáxima constante. Esto ha permitido demostrar que la mejoría en la capacidad aeróbica se asocia a menores concentraciones de lactato y requerimientos ventilatorios para un nivel determinado de ejercicio (Casaburi, R. *et al.*; 1991; Maltais, F. *et al.*; 1996a; Maltais, F. *et al.*; 1997). En la misma línea, se ha demostrado recientemente que se induce una mejoría tanto en la resistencia de las piernas como en la capacidad de ejercicio en los pacientes con EPOC que se someten a un entrenamiento de baja intensidad (Clark, C.J. *et al.*; 1996). Todo lo anterior refleja sólidamente que existe una estrecha correlación entre la función muscular periférica y la capacidad de ejercicio en los pacientes con EPOC.

### Cambios estructurales del músculo cuádriceps

Característicamente los cuádriceps de pacientes con EPOC presentan una menor masa muscular (Schols, A.M. *et al.*; 1991b; Wuyam, B. *et al.*; 1992), un menor número de capilares (Coronell, C. *et al.*; 2003; Jobin, J. *et al.*; 1998; Simard, C. *et al.*; 1996), un contenido mitocondrial normal (Simard, C. *et al.*; 1996), una menor concentración de mioglobina (Whittom, F. *et al.*; 1998), una atrofia de fibras tipo I y II (Hughes, R.L. *et al.*; 1983; Whittom, F. *et al.*; 1998), una disminución del porcentaje de fibras tipo I (Hildebrand, I.L. *et al.*; 1991) y un incremento de isoformas de miosina tipo IIx (Satta, A. *et al.*; 1997). En la Tabla 7 se resumen los artículos publicados hasta la fecha acerca de la tipificación de la cadena pesada de miosina en el músculo cuádriceps de pacientes con EPOC.

Desde el punto de vista de su capacidad metabólica, la concentración de las enzimas aeróbicas (citrato-sintetasa, succinil-deshidrogenasa, hidroxiacetilCoA) disminuye, mientras que la mayoría de las enzimas anaeróbicas

**TABLA 7. TIPIFICACIÓN DEL MÚSCULO CUÁDRICEPS DE PACIENTES CON EPOC**

POBLACIÓN	FIBRAS I	FIBRAS IIA	FIBRAS IIX	AUTOR
EPOC, caucásicos del Mediterráneo	37 ± 17	40 ± 13	23 ± 22	(Satta, A. <i>et al.</i> ; 1997)
EPOC, caucásicos de Estados Unidos	34 ± 14	38 ± 15	15 ± 12	(Whittom, F. <i>et al.</i> ; 1998)
EPOC, caucásicos de Estados Unidos	27 ± 17	51 ± 15	22 ± 16	(Maltais, F. <i>et al.</i> ; 1999)
EPOC, caucásicos del Mediterráneo	29 ± 14	55 ± 15	15 ± 12	(Hayot, M. <i>et al.</i> ; 2005)

Los datos son mostrados como media ± DS; ND: No Determinado.

(especialmente LDH y la hexoquinasa [HK, en inglés]) no se modifican sustancialmente (Jakobsson, P. *et al.*; 1995; Maltais, F. *et al.*; 1996b). La fosfofructocinasa, sin embargo, parece incrementarse moderadamente (Jakobsson, P. *et al.*; 1995). Más recientemente se ha demostrado que la enzima citocromo-oxidasa (COX), el último eslabón de la fosforilación oxidativa, está incrementada en estos pacientes, al parecer como fenómeno compensatorio ante una probable hipoxia celular crónica o recurrente (Lundgren, F. *et al.*; 1989). Sin embargo, el aporte periférico de oxígeno en los pacientes con EPOC está preservado (Maltais, F. *et al.*; 1998; Sala, E. *et al.*; 1999), hecho que refuerza la hipótesis de que existe una alteración en la eficacia de la utilización del oxígeno a nivel intracelular. De otra parte, en los pacientes con EPOC la acidificación del miocito es más rápida y mayor que la observada en sujetos sanos (Engelen, M.P. *et al.*; 2000; Sala, E. *et al.*; 1999) debido a la producción temprana de lactato (Casaburi, R. *et al.*; 1991; Maltais, F. *et al.*; 1996b).

### Cambios estructurales del músculo deltoides

Nuestro grupo ha demostrado recientemente que las fibras de los músculos deltoides de los pacientes con EPOC conservan un diámetro normal y una proporción fibrilar similar a los de los individuos sanos (Hernandez, N. *et al.*; 2003). Desde un punto de vista metabólico, también la concentración de las enzimas, tanto de la cadena oxidativa como la glicolítica, está preservada (Pasto, M.; 1988). Finalmente,

y desde el punto de vista del contenido en proteínas contráctiles, la expresión de las cadenas pesadas de miosina I y II esta dentro de la normalidad a pesar de la presencia de EPOC (Hernandez, N. *et al.*; 2003; Pasto, M.; 1988)

### Cambios estructurales del músculo tibial anterior

Estudios preliminares sugieren que las capacidades oxidativa y glucolítica de los músculos tibial anterior están preservadas a pesar de la presencia de EPOC y del tratamiento crónico con esteroides (Pouw, E.M. *et al.*; 2000). Asimismo, el contenido de glucógeno y de fosfatos de alta energía no presenta diferencias con respecto a lo hallado en músculos de individuos sanos (datos no publicados).

### FACTORES SISTÉMICOS DE LA EPOC IMPLICADOS EN LA DISFUNCIÓN MUSCULAR GLOBAL

Si bien está comprobada la existencia de una disfunción muscular global en la EPOC, dos puntos críticos que están aún por definirse son sus causas y, en consecuencia, su tratamiento (preventivo o curativo). Esto obliga a hipotetizar sobre la relación que puede tener el **pulmón** (como órgano blanco del tabaquismo) con cambios funcionales y estructurales de otros órganos y sistemas lejanos como los **músculos respiratorios y periféricos**. Algunos grupos de investigadores han resaltado que deben ser factor(es) con efectos sistémi-

cos los que hacen que los pacientes con EPOC sufran una disfunción muscular global. Entre estos factores se han mencionado algunos relacionados directamente con la presencia de EPOC (p.e. hipoxia e hipercapnia crónicas, presencia de mediadores inflamatorios, malnutrición); otros se hallan asociados a la comorbilidad (diselectrolitemias, insuficiencia cardíaca, decondicionamiento, senilidad) y, por último, existen factores relacionados con el tratamiento de la misma enfermedad.

La **hipoxia crónica** deteriora la función muscular dado que hace al músculo más proclive al estrés oxidativo (Koechlin, C. *et al.*; 2005), disminuye los depósitos intracelulares de energía (p.e. glucógeno y glucosa) y de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, aumenta los valores de hexoquinasa y puede afectar la síntesis intramitocondrial de otras proteínas (Pastoris, O. *et al.*; 1995).

La **hipercapnia crónica** también se supone un factor deletéreo sobre la función muscular. Esto se deduce a partir de hallazgos tanto en modelos experimentales (Trivedi, B. *et al.*; 1966) como en humanos con fracaso respiratorio hipercápnico agudo (Gertz, I. *et al.*; 1977) en los que se encuentra un total trastorno metabólico muscular, que es reversible con las intervenciones terapéuticas (Gertz, I. *et al.*; 1977).

Un incremento en la concentración de los niveles de algunos **mediadores inflamatorios, locales o sistémicos** es común en los pacientes con EPOC (Barnes, P.J.; 2004; Barnes, P.J.; 2005; Gan, W.Q. *et al.*; 2004). Se considera que su efecto está relacionado con la capacidad de precipitar proteólisis tanto a través de la inducción de **estrés oxidativo** muscular (Barreiro, E. *et al.*; 2003; Barreiro, E. *et al.*; 2005b; Montes de Oca, M. *et al.*; 2005), como por otras vías. El músculo estriado posee numerosas vías metabólicas normales por las cuales se producen radicales superóxidos y óxido nítrico que, por otra parte, son esenciales para una función contráctil óptima (Buck, M. *et al.*; 1996; Kobzik, L. *et al.*; 1994). Es por

lo anterior que existe un sistema antioxidante constitutivo, fundamentalmente representado por el glutatión reducido. Si la homeostasis de este sistema reducción-oxidación (**sistema redox**) se altera por los mediadores inflamatorios, se desencadena un desequilibrio denominado stress oxidativo, el cual activa una vía de degradación de proteínas dependiente del calcio, la cual representa la forma fundamental del daño muscular mediado por oxidantes (Jackson, M.J. *et al.*; 1993).

Otra forma de estrés oxidativo muscular está precipitada por la inmovilización y atrofia musculares, pues disminuyen el contenido de glutatión reducido y aumentan el glutatión oxidado y los peróxidos del metabolismo lipídico (Kondo, H. *et al.*; 1992). El óxido nítrico también es una molécula constitutiva del músculo estriado que interviene en la excitación-contracción y el transporte de la glucosa (Kobzik, L. *et al.*; 1994). Se supone que la concentración de óxido nítrico en el músculo esquelético podría aumentar en los pacientes con EPOC y favorecer el estrés oxidativo muscular (Buck, M. *et al.*; 1996). Además del estrés oxidativo, se supone que existen otras vías proteolíticas que pueden ser activadas por los mediadores inflamatorios. Así, por ejemplo, la administración del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , una citocina proinflamatoria) se asocia a un mayor catabolismo muscular (Flores, E.A. *et al.*; 1989; Hall-Anger, M. *et al.*; 1990; Takabatake, N. *et al.*; 2000).

Al contrario de lo que sucede con los tres factores antes mencionados (hipoxia, hipercapnia e inflamación) los efectos fisiopatológicos que pueden tener la **desnutrición** y la **pérdida de masa muscular** están bastante bien definidos. Sin embargo, puede haber alteraciones funcionales evidentes aún antes que se detecte una pérdida de masa muscular. Esto está probablemente en relación con desbalances en el transporte de membrana (Jeejeebhoy, K.N.; 1994). Está claro, no obstante, que la malnutrición prolongada se asocia a una pérdida proporcional de masa muscular, que afecta especialmente a

las fibras de tipo II (Kelsen, S.G. *et al.*; 1985). En consecuencia, se desencadena una pérdida de fuerza, una disminución de la resistencia y un enlentecimiento de la tasa de relajación (Lopes, J. *et al.*; 1982). Aunque está bien definido que los pacientes con EPOC pueden presentar alteraciones nutricionales más o menos importantes, existen datos muy limitados que evalúen específicamente estos aspectos.

Por otra parte, los pacientes con EPOC presentan frecuentemente otras **condiciones comórbidas** que también afectan a la fuerza y a la resistencia musculares, tanto respiratoria como periférica. Entre ellas están las alteraciones electrolíticas crónicas, el fallo cardíaco crónico, la diabetes o la hipertensión arterial. Otras condiciones asociadas, como la edad avanzada y el decondicionamiento por sedentarismo e inactividad física, también se han postulado como factores capaces de desenca-

denar alteraciones musculares globales en estos pacientes.

Finalmente, se ha dado importancia a los **corticosteroides** como factor inductor de la disfunción muscular en los pacientes con EPOC. Existen datos que sugieren una asociación directa, tanto de la dosis como de la duración del tratamiento, con el grado de debilidad de las piernas (Calverley, P.M.; 2005; Decramer, M. *et al.*; 1994), el incremento de los valores séricos de LDH, la atrofia y necrosis de las fibras del cuádriceps en los pacientes con EPOC. Más aún, el seguimiento de los pacientes con el diagnóstico de miopatía esteroidea ha demostrado que la supervivencia es menor que la de los pacientes con EPOC e igual gravedad (Decramer, M. *et al.*; 1996).

## Capítulo 6

# ESTUDIOS ORIGINALES DE INVESTIGACIÓN

### NOTA PRELIMINAR

La EPOC, además de su evidente obstrucción al flujo aéreo y toda la sintomatología pulmonar que la acompaña, presenta signos y síntomas sistémicos que se han venido explorando desde hace algún tiempo (Agusti, A.G. *et al.*; 2003; Agusti, A.G.; 2005; Decramer, M. *et al.*; 2005; Killian, K.J. *et al.*; 1992). De nuestro particular interés está la afectación que presentan los músculos respiratorios y periféricos, sobre todo los de las extremidades inferiores y, particularmente, el cuádriceps de los pacientes con EPOC. Esta disfunción muscular afecta las actividades de la vida diaria, la tolerancia al ejercicio, limita la calidad de vida y disminuye la expectativa de vida de estos pacientes. De otra parte, los músculos respiratorios de estos pacientes se encuentran en desventaja durante una agudización, lo que lleva a una rápida falla durante la exacerbación de la enfermedad, aumenta los costes sanitarios por recaídas e incrementa la mortalidad debida a esta enfermedad.

Una de las posibles causas de disfunción muscular en los pacientes con EPOC puede ser la pérdida de peso debida a la disminución de masa muscular o masa magra; nos dedicamos a evaluar, mediante un trabajo retrospectivo, los datos antropométricos y espirométricos de los pacientes con EPOC que asistieron durante 2 años a nuestro Laboratorio de Función Respiratoria del Hospital del Mar de Barcelona (n=3353). Esto dió como resultado un artículo en *Archivos de Bronconeumología* (Coronell, C. *et al.*; 2002b) y una carta a *Clinical Nutrition* (Coronell, C. *et al.*; 2002a) donde se demostró que la prevalencia de **bajo peso** en

pacientes con EPOC en un hospital con predominante población mediterránea con, índice de masa corporal (IMC) por debajo de 20 kg/m<sup>2</sup>, fue de tan sólo 6,6%, cifra que se reducía al 3,1% si el dintel escogido era de 18 kg/m<sup>2</sup>. Estas cifras van claramente en oposición a la prevalencia referida en el mundo anglosajón y del norte-centro europeo, que muestra una prevalencia de **bajo peso** en pacientes con EPOC que oscila entre el 25 y el 35% (Congleton, J.; 1999; Debigare, R. *et al.*; 2001; Franssen, F.M. *et al.*; 2002).

Teniendo en cuenta estos datos de escasa prevalencia de bajo peso en nuestros pacientes con EPOC, no se explica la alta prevalencia de disfunción muscular en ellos. Por ello nos dedicamos a evaluar en un estudio prospectivo y en pacientes con EPOC grave (n=36) las variables de función muscular periférica, específicamente del músculo cuádriceps. Esto originó una publicación en el *European Respiratory Journal* (Coronell, C. *et al.*; 2004) donde se demostró que los pacientes con EPOC tenían una disminución de un 43% de su fuerza muscular, al igual que una disminución de un 77% en su resistencia, al compararlos con controles del mismo grupo etáreo.

Tratando de profundizar en la causa de la disfunción muscular periférica en los pacientes con EPOC, hicimos a continuación otro estudio prospectivo donde evaluamos el daño sarcoplásmico y sarcomérico mediante inmunohistoquímica y microscopía electrónica. Este trabajo se halla enviado a *Chest* (Coronell, C. *et al.*; 2006) para revisión y, en él, se demuestra por primera vez que los pacientes con EPOC



presentan mayor daño a nivel del músculo cuádriceps que los controles sanos.

Debido a que en la EPOC los músculos periféricos, específicamente los de las extremidades inferiores, pudieran estar afectados predominantemente por el sedentarismo, decidimos estudiar otras causas de disfunción muscular en un grupo de músculos en que este factor se hallara ausente, como son los músculos respiratorios. Estos mantienen su nivel de actividad normal o incluso aumentada. Para ello tomamos un músculo como el intercostal externo, que es fácilmente accesible a la biopsia, siguiendo un modelo mínimamente invasivo descrito por nuestro grupo (Aguar, M.C.;

1995; Ramirez-Sarmiento, A. *et al.*; 2002b). Como en trabajos precedentes ya habíamos valorado el daño sarcomérico (Orozco-Levi, M. *et al.*; 2001b), el estrés oxidativo (Barreiro, E. *et al.*; 2005a) o la actividad enzimática (Pasto, M.; 1988), en esta ocasión el trabajo se centró en la evaluación de la actividad inflamatoria. Se ha enviado este trabajo para revisión al ***European Respiratory Journal*** (Casadevall, C. *et al.*; 2006). En él se ha demostrado que las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e Interleucina 6 (IL-6) se encuentran aumentadas en los músculos intercostales externos de los pacientes con EPOC al compararlo con los controles sanos.

## Estudio 1

# SÍNDROME DE BAJO PESO ASOCIADO A LA EPOC EN NUESTRO MEDIO

*Arch Bronconeumol. 2002;38:580-4.*

---

### HIPÓTESIS DEL ESTUDIO.

**Hipótesis Nula ( $H_0$ ):** Los pacientes con EPOC originarios del área mediterránea tienen alterado su estado nutricional en términos de peso e índice de masa corporal (IMC). Específicamente, la gravedad de la EPOC se asocia de forma directa con el deterioro nutricional, y no hay diferencias en la prevalencia del síndrome de bajo peso descrita en otros países.

**Hipótesis Alternativa ( $H_1$ ):** Los pacientes con EPOC originarios del área mediterránea no tienen alterado su estado nutricional en términos de peso e IMC. No existe una asociación entre la gravedad de la EPOC y el estado nutricional, lo que sería una controversia respecto a los estudios de las relaciones entre peso corporal y EPOC descritos en otros países.

### Objetivo general:

Evaluar estado nutricional (peso corporal total, índice de masa corporal) en pacientes con EPOC originarios de la región mediterránea.

### Objetivos específicos:

- Determinar la relación eventual entre la presencia de EPOC y bajo peso corporal (según IMC) en población originaria de nuestro medio.
- Evaluar la presencia de relación dosis-respuesta ante la gravedad de la EPOC y el grado de deterioro del estado nutricional.
- Calcular la prevalencia de bajo peso corporal teniendo como dintel diferentes puntos de corte de IMC.

Coronell C, Orozco-Levi M, Ramírez-Sarmiento J, Martínez-Llorens J,  
Broquetas J, Gea J.

*Síndrome de bajo peso asociado a la EPOC en nuestro medio*

Archivos de Bronconeumología. 2002; 38: 580-4

## COPD and body weight in a Mediterranean population

*Clinical Nutrition* 2002;21:437

*Clinical Nutrition* (2002) 21(5): 437–440  
© 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1054/clnu.2002.0572, available online at <http://www.idealibrary.com> on IDEAL®

### CORRESPONDENCE

#### COPD and body weight in a Mediterranean population

Dear Sir

We have read with great interest the review article recently published by Franssen et al. in *Clinical Nutrition* on the impact of starvation, deconditioning and ageing in chronic organ diseases, such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and chronic heart failure (1). However, we would like to make some comments. It is certainly true that weight loss appears as a common finding (25–30%) in patients with COPD living in North America and Northern Europe (2, 3). This is clinically important since weight loss is associated with skeletal muscle dysfunction, exercise tolerance, quality of life and survival (4, 5). However, there is a general clinical perception that weight loss would be less common in the Mediterranean area, than in Northern countries. In this regard, researchers from reference centers performing studies on underweight COPD patients in our area, systematically require full collaboration from other centers to recruit enough number of subjects. With this and Franssen's article in mind, we investigated retrospectively, anthropometric data from consecutive non-selected COPD patients tested in our Pulmonary Function laboratory in the last 2 years ( $n = 3353$ ). Although most of them exhibited a moderate-to-severe disease ( $FEV_1$ ,  $55 \pm 9\%$  pred), the prevalence of subjects with body mass index (BMI)  $< 18 \text{ kg/m}^2$  (which can be considered a threshold with clinical relevance) was only 4.1%. We feel that although our observation should be confirmed with a larger and multicentric study, it strongly suggests that some

populations of the Mediterranean area (for instance Catalans, living in North Eastern Spain and South Eastern France) could be protected against weight loss associated with COPD. Other populations with similar ethnic origins, but different lifestyles (such as the French Quebequers) (2), also appear to exhibit a high prevalence of underweight COPD patients. Therefore, we suggest that specific life habits can account for this difference.

Carlos Coronell, Mauricio Orozco-Levi, Joaquim Gea  
*Servei de Pneumologia, Hospital del Mar-I.M.I.M.  
Universitat Pompeu Fabra (UPF) &  
Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)  
Barcelona, Catalonia, Spain*

### References

1. Franssen F M, Wouters E F, Schols A M. The contribution of starvation, deconditioning and ageing to the observed alterations in peripheral skeletal muscle in chronic organ diseases. *Clin Nutr* 2002; 21: 1–14
2. Debigare R, Cote C H, Maltais F. Peripheral muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease. Clinical relevance and mechanisms. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1712–1717
3. Congleton J. The pulmonary cachexia syndrome: aspects of energy balance. *Proc Nutr Soc* 1999; 58: 321–328
4. Schols A M W J, Slangen J, Volovics L, Wouters E F M. Weight loss is a reversible factor in the prognosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1791–1797
5. Engelen M P, Schols A M, Baken W C, Wesseling G J, Wouters E F. Nutritional depletion in relation to respiratory and peripheral skeletal muscle function in out-patients with COPD. *Eur Respir J* 1994; 7: 1793–1797

Submission date: 10 May 2002 Accepted: 10 May 2002

© 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1054/clnu.2002.0573, available online at <http://www.idealibrary.com> on IDEAL®

#### Reply to Dr Coronell et al.

Dear Sir

In a reaction to our review paper about the observed alterations in peripheral skeletal muscles in chronic organ diseases (1), Coronell and colleagues comment that the prevalence of nutritional abnormalities in COPD patients in the Mediterranean area is lower than in patients with similar ethnic origins in Northern countries. They propose that lifestyle differences between these populations might be responsible for this observation. Although their letter has absolutely no bearing on our review article, we would like to respond to this hypothesis.

The relationship between nutritional status and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is well established. Published prevalence rates vary from 20% in clinically stable out-patients (2) up to 70% in patients suffering from acute respiratory failure (3) depending on patient characteristics and the definition of nutritional status. Epidemiological studies in different patient populations in Europe, USA and Canada have identified a low body weight for height (4–7) and a history of weight loss (8) as independent predictors of mortality in COPD patients. More specifically depletion of fat-free mass, mainly consisting of skeletal muscle mass, contributes to exercise intolerance (9) and muscle weakness (10) and adversely affects health-related quality

## Estudio 2

# RELEVANCE OF ASSESSING QUADRICEPS ENDURANCE IN PATIENTS WITH COPD

*Eur Respir J. 2004;24:129-136.*

---

### HIPÓTESIS DEL ESTUDIO

**Hipótesis Nula ( $H_0$ ):** Los pacientes con EPOC de nuestro medio tienen relativamente preservado su estado nutricional. Esto permite hipotetizar que la fuerza y la resistencia muscular periférica están preservadas en estos pacientes.

**Hipótesis Alternativa ( $H_1$ ):** Los pacientes con EPOC de nuestro medio muestran disfunción muscular periférica (i.e. debilidad y fatigabilidad) a pesar de tener preservado su peso e IMC.

### Objetivo general:

Evaluar la fuerza y resistencia muscular en las extremidades inferiores de los pacientes con EPOC de nuestro medio, y las relaciones que pueden existir con el estado nutricional, la gravedad de la enfermedad y la actividad física cotidiana.

### Objetivos específicos:

- Determinar la fuerza del cuádriceps de pacientes con EPOC y compararla con individuos sanos (grupo control) apareados por género, edad e IMC.
- Evaluar la resistencia del cuádriceps de pacientes con EPOC y compararla con individuos sanos (grupo control) apareados por género, edad e IMC.
- Estimar la relación que puede existir entre la debilidad y la fatigabilidad del cuádriceps con la gravedad de la EPOC. La fuerza del cuádriceps de pacientes con EPOC y compararla con individuos sanos (grupo control) apareados por género, edad e IMC.
- Evaluar la potencial correlación entre las medidas de fuerza y resistencia en el cuádriceps de pacientes con EPOC, y deducir la capacidad predictiva de una sobre otra.
- Evaluar la presencia de relación dosis-respuesta ante la gravedad de la EPOC y el grado de disfunción (debilidad y fatigabilidad) del cuádriceps de pacientes con EPOC.

Coronell C, Orozco-Levi M, Méndez R, Ramírez-Sarmiento A, Gáldiz JB, Gea J.

*Relevance of assessing quadriceps endurance in patients with COPD.*

Eur Respir J. 2004 Jul;24(1):129-36.

Comment in:

Eur Respir J. 2004 Jul;24(1):6-7.

## Estudio 3

# **INJURY OF PERIPHERAL MUSCLES IN SUSCEPTIBLE SMOKERS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE**

*Enviado a revisión a CHEST, 2005.*

---

### **HIPÓTESIS DEL ESTUDIO**

Hipótesis nula ( $H_0$ ): Los músculos respiratorios de pacientes con EPOC muestran signos de daño celular. Sin embargo, los músculos periféricos de estos pacientes no tienen alterada la estructura celular (membrana o aparato contráctil) lo cual permite excluir la presencia de factores deletéreos con efecto sistémico.

Hipótesis Alternativa ( $H_1$ ): Los músculos periféricos de los pacientes con EPOC tienen alteraciones estructurales a nivel de la integridad de la membrana celular o del aparato contráctil (i.e., daño muscular) lo que permite postular la presencia de factores deletéreos con efecto sistémico sobre todos los músculos de estos pacientes, tanto respiratorios como periféricos.

### **Objetivo general:**

Investigar la presencia de alteraciones de la integridad de la membrana muscular (sarcolemma) y del aparato subcelular contráctil (sarcómeros) en músculos periféricos de pacientes con EPOC.

### **Objetivos específicos:**

- Evaluar la relación que puede existir entre la presencia de EPOC y daño celular en el músculo cuádriceps (membrana, sarcómeros) y compararlos con individuos sanos (grupo control) apareados por género, edad e IMC.
- Determinar la relación que puede existir entre tabaquismo y daño celular en el músculo cuádriceps de pacientes con EPOC.
- Evaluar la relación que puede existir entre la gravedad de la EPOC y el nivel de actividad física habitual con la presencia y gravedad del daño celular de los músculos cuádriceps de estos pacientes.
- Estimar la relación que puede existir entre la magnitud de daño de membrana con la disrupción de sarcómeros en el músculo cuádriceps de individuos sanos y de pacientes con EPOC.



**Injury of peripheral muscles in susceptible smokers with chronic obstructive pulmonary disease**

Journal:	CHEST
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Manuscript
Department:	Clinical Investigations - Pulmonary
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Orozco-Levi, Mauricio; Hospital del Mar - UPF, Respiratory Medicine Coronell, Carlos; Hospital del Mar-UPF, Respiratory Medicine Ramirez-Sarmiento, Alba; Hospital del Mar-IMIM, Respiratory Department Lloreta, Josep; Hospital del Mar-UPF, Pathology Martinez-Llorens, Juana M.; Hospital del Mar-IMIM, Respiratory Department; Hospital del Mar-IMIM, Respiratory Medicine Galdiz, Juan B.; Hospital de Cruces, Respiratory Medicine Gea, Joaquim; Hospital del Mar-IMIM-UPF, Respiratory Medicine
Keywords:	CHRONIC OBSTRUCTIVE PUL. DIS., EXERCISE PULMONARY, RHABDOMYOLYSIS, EXERCISE, INJURY

powered by ScholarOne  
Manuscript Central™



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Injury of peripheral muscles in susceptible smokers with Chronic Obstructive Pulmonary Disease.

Carlos Coronell, Alba Ramirez-Sarmiento, Josep Lloreta<sup>1</sup>, Juana Martínez-Llorens, Juan B. Galdiz<sup>2</sup>, Joaquim Gea, and Mauricio Orozco-Levi, on behalf of the ENIGMA in COPD group.

**Authors' affiliation:** Unitat de Recerca Muscular i Respiratòria (URMAR), Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), and Servei de Pneumologia, Hospital del Mar, Barcelona. (1) Servei de Anatomia Patològica, Hospital del Mar. CEXS-Universitat Pompeu Fabra and Universitat Autònoma de Barcelona. Catalonia, Spain. Barcelona (Catalonia), Spain. (2) Department of Respiratory Medicine, Hospital de Cruces, Barakaldo, Basque Country, Spain.

**Corresponding author:** M. Orozco-Levi, MD, PhD. Unitat de Recerca Muscular i Respiratòria, IMIM. Carrer Dr. Aiguader, 80. Barcelona E-08003. Fax (+34) 93 2213237. E-mail: [morozco@imim.es](mailto:morozco@imim.es).

**Source of support:** Supported, in part, by Red Respira (RTIC C03/11, Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III), and SEPAR, "Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España", Grant Code 72.129.052.

**Preliminary results:** Presented, in part at the American Thoracic Society Annual Meeting in Orlando (FLA), USA, 2004.

**Running Head:** Injury of peripheral muscles in COPD.

**Online data supplement:** This article has an online data supplement, which is accessible from this issue's table of content online at [www.chestjournal.org](http://www.chestjournal.org).

### **WORD COUNT FOR BODY OF THE MANUSCRIPT:**

Introduction	:	302	words
Methods	:	874	words
Results	:	394	words
Discussion	:	1629	words
Total word count:	:	3194	words

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**ABSTRACT.**

Muscle injury has clinical relevance in diseased individuals because it is associated with muscle dysfunction in terms of decreased strength and/or endurance. This study was aimed at answering three questions: if the presence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is associated with peripheral muscle injury; if muscle injury is associated with some of the relevant functional impairment in the muscles; and if muscle injury can be solely justified by deconditioning. Twenty-one male COPD patients were eligible for the study. Seven healthy volunteers recruited from the general population were included as controls. Function of the quadriceps muscle was assessed through specific single leg exercise (strength and endurance). Cellular (light microscopy) and subcellular (electron microscopy) techniques were used to evaluate muscle injury on biopsies from the *vastus lateralis* muscle. Signs of injury were found in muscles from both control and COPD patients, not only in cases showing severe airflow obstruction but also in the mild or moderate stages of the disease. Current smoking and presence of COPD were significantly associated with increased injury of the muscle as assessed by light and electron microscopy techniques. We conclude that peripheral muscle injury is evident in mild, moderate and severe stages of COPD even in the absence of respiratory failure, hypercapnia, chronic steroid treatment, low body weight, or some coexisting disease. These findings support that systemic factors with deleterious effect are acting on peripheral muscles of smokers with COPD increasing the susceptibility of the muscle fibers to membrane and sarcomere injury.

**ABSTRACT WORD COUNT:** 246

**KEY WORDS:** COPD, skeletal muscles, membrane, sarcomere, injury.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**INTRODUCTION.**

Muscle injury is a concept that refers to a group of morphological abnormalities in the muscles associated with either exertion or diseases.<sup>1,2</sup> Typical signs of muscle injury are the disruption of cell membrane structures (sarcolemma, mitochondria, sarcoplasmic reticulum and T-tubules), degeneration of the cytoplasm, and disorganization of the contractile myofibrils (including sarcomere disruptions, Z-band streaming, misalignment of the myofilaments, and desmin loss).<sup>1,2</sup>

Muscle injury is not an irrelevant or anecdotal observation. It deserves attention and has a clinical impact because it is associated with muscle dysfunction (i.e., decreased strength and/or endurance).<sup>1,2</sup> Recent studies have demonstrated that the diaphragm (the main respiratory muscle) shows signs of injury as assessed by both light<sup>3</sup> and electron<sup>4</sup> microscopy in patients suffering chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The greatest injury is found after inspiratory loading (i.e., diaphragm exertion).<sup>4</sup> Susceptibility to additional sarcomere injury in response to inspiratory loading is higher in the diaphragm of the COPD patients (up to three times higher when compared with controls) despite clinical stability and no significant comorbidity.<sup>4</sup>

The ultimate cause of diaphragm injury present in COPD is not clear. Although chronic increased loads may increase regional stress and strain on the diaphragm,<sup>1</sup> other non-mechanical factors with systemic effects (e.g., inflammatory mediators) could also participate in this injury.<sup>5</sup> We postulated that, if this is the case, other skeletal (non-respiratory) muscles should also demonstrate increased signs of injury in association with the presence of COPD. By employing two sensitive morphological techniques to detect both cellular (sarcolemmal) and subcellular (sarcomeric) signs of muscle injury, the purpose of this cross-sectional study was, firstly, to determine if the presence of COPD is associated with peripheral muscle injury; secondly, to evaluate if muscle

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

injury is associated with some relevant functional impairment in the muscles; and,  
thirdly, to determine if muscle injury can be justified by deconditioning.

Privileged Communication

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## **METHODS.**

**STUDY DESIGN.** This study is a case-control investigation of the potential associations between COPD and peripheral muscle injury. Cases and control subjects were recruited from the Hospital del Mar, a third level hospital at Barcelona (Spain). A total of twenty-one subjects ( $67 \pm 7$  yr.) were selected for the study, and stratified into two groups according to pulmonary function tests (COPD [n=14] and controls [n=7]).

**ETHICS.** The Research Committee of Human Investigation at the Municipal Institute for Medical Research approved the study and informed written consent was obtained from each participant after a full explanation of the purposes and characteristics of the study.

**IDENTIFICATION AND ENROLLMENT OF CASES.** Eligible cases were identified from patients attending the pulmonary outpatient clinic of the center. For a patient to be enrolled as a case, a diagnosis of COPD had to be present on the basis of long time-exposure to cigarette smoke, with signs and symptoms of chronic bronchitis and/or pulmonary emphysema and functional criteria of chronic and irreversible airflow obstruction ( $FEV_1/\text{forced vital capacity} \leq 70\%$ ,  $FEV_1 \leq 80\%$  pred, and  $< 12\%$  change in  $FEV_1$  following 400 mg of inhaled salbutamol) according to ATS/ERS criteria.<sup>6</sup> All patients were clinically stable for  $\geq 4$  months from the last exacerbation and received inhaled bronchodilators. The presence of cardiopathies, metabolic diseases or joint dysfunction was considered as exclusion criteria.

**IDENTIFICATION AND ENROLLMENT OF CONTROLS.** To reduce the possibility of a biased selection of hospitalized controls, we prospectively selected a group of healthy volunteers recruited from the general population. We used frequency matching on age because age is a known risk factor for changes in muscle structure and function. Control subjects were sought as close as possible within each age interval to the cases (60-65, 66-70, 70-75 years). After ascertaining the absence for criteria of

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

COPD or absence of some disease able to affect muscle function, the subject was asked for permission to be interviewed and enrolled in the study. Healthy status was defined as the absence of known diseases as assessed by a systematic medical interview, general physical examination (performed by experienced physicians from the authors group), and normal pulmonary function.

#### MEASUREMENTS.

**Anthropometry and nutritional evaluation.** Levels of serum albumin, cholesterol and transferrin were determined as biological parameters. Body weight and body mass index (BMI) was evaluated as anthropometric parameters.

**Daily physical activity (PA).** Daily PA was assessed by the Baecke's questionnaire<sup>7</sup> modified for elderly people.<sup>8,9</sup> This questionnaire evaluated household activities, sports activities and other physically active leisure-time activities during the previous year, and gave an overall PA score. The subjects were asked to describe the type of activity, hours per week participation and the period of the year in which the activity was normally performed. All activities were classified according to posture and movement. An intensity code based on net energetic costs of activities according to Bink et al.<sup>10</sup> was used to classify each activity. The method evaluates the activity of older subjects as high, medium or low. With this method, subjects who obtained a score  $\leq 9$  were classified as having low PA, and thus "sedentary".<sup>8,9,11</sup>

**Pulmonary and respiratory muscle function.** Pulmonary and respiratory muscle function was assessed by forced spirometry<sup>12</sup> (Datospir 900; SIBEL, Barcelona, Spain), static lung volumes, airway resistance and carbon monoxide transfer factor<sup>13</sup> (Masterlab, Jaeger, Würzburg, Germany). Reference values used were those for the Mediterranean population.<sup>14</sup> Arterial blood samples were obtained from the radial artery of the non-dominant arm for partial pressure of oxygen and partial pressure of carbon dioxide measurements using conventional polarographic techniques (Rapidlab 860;

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Chiron/Diagnostic, Wuppertal-Barmen, Germany). We followed the guidelines for grading disease severity in COPD of the Global Initiative for Obstructive Lung Disease.<sup>15</sup>

**Muscle biopsies and sample processing.** Biopsies from the vastus lateralis were taken at middle of the thigh (approximately 15-cm above the patella) as described elsewhere.<sup>16</sup> For assessment and quantification of muscle injury we chose two non-redundant (complimentary) methods based on light and electron microscopy. For the former, one part of each sample was processed for immunohistochemical techniques using a polyclonal anti-human antibody directed against albumin (Code No. A0001; DakoCytomation, DK-2600 Glostrup, Denmark) as a primary antibody (figure 1). Increase permeability of the cellular membrane to albumin is a sign of membrane injury.<sup>17</sup> The second part of each muscle biopsy was processed to evaluate signs of subcellular muscle injury through electron microscopy. Muscle samples were processed according to semiautomatic methods (Tissue Processor E9200; BioRad, Watford, UK). Disrupted sarcomere were evaluated as a sign of muscle injury and defined as has been described elsewhere (figures 2 and 3).<sup>18</sup> Additional detail on the method for making these measurements is provided in an online data supplement.

**Quadriceps muscle function: strength and endurance.** Function of the dominant quadriceps muscle was evaluated after two weeks of the biopsy procedure. Both muscle strength and endurance of the dominant leg were evaluated during specific (local) single leg exercises at an exercise bench.<sup>19</sup> Additional detail on the method for making these measurements is provided in an online data supplement.

**STATISTICAL ANALYSIS.** All parameters were checked for normality of distribution. A comparison of case and control characteristics was conducted using the *t* test (for quantitative variables of normal distribution), Kruskal-Wallis test (for

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

quantitative variables of non-normal distribution) or  $\chi^2$  (for qualitative variables).<sup>20</sup>

Statistical significance was considered at  $p < 0.05$ .

Privileged Communication



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**RESULTS.**

**Nutritional status and anthropometrical data.** The general characteristics of the study population are shown in Table 1, nutritional variables were within the reference values in both study groups. Age, body weight and BMI were similar within the study groups.

**Pulmonary function.** All control individuals showed normal pulmonary function tests. The group of patients with COPD included a wide range of airflow obstruction ( $FEV_1$  21–76% pred). A total of 13 patients (93%) showed pulmonary air trapping (defined as residual volume/total lung capacity >35%), 6 patients (43%) showed pulmonary hyperinflation (defined as total lung capacity >120% pred), and 10 patients (71%) showed a decreased CO transfer factor (table 1). A total of 12 patients showed hypoxemia ( $Pa,O_2 < 60$  mmHg).

**Daily Physical Activity (PA) scores.** Daily PA scores ranged 2.9–21.9 with a median value of 10. Four patients scored <9 in the PA questionnaire. No significant statistical difference in PA scores was observed between COPD patients and controls (Table 1).

**Strength and endurance of the quadriceps muscle.** The values of  $Q_{MVC}$  showed a wide range in the two study groups. The control group showed a  $Q_{MVC}$  of 17–49 kg. The COPD patients showed quadriceps weakness and increased susceptibility to fatigue as shown in Table 2. All healthy controls reached the 30-min time limit when performing the  $Q_{Tlim}$  test. In contrast, all COPD patients showed an early onset of task failure as represented by ~66% lower  $Q_{Tlim}$  when compared with control volunteers. This decrease was evident even in those patients showing only mild or moderate airflow obstruction and relatively normal PA. Impairment in the  $Q_{Tlim}$  was irrespective of daily PA scores. Task failure was associated with limiting symptoms (discomfort) of the exercised thigh, and a transitory decrease in the quadriceps strength after task failure. The  $Q_{MVC}$  and  $Q_{Tlim}$  did not correlate with pulmonary function, nutritional parameters or daily PA.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Association between muscle injury, smoking and COPD.** Irrespectively of the smoking status, both sarcolemmal and sarcomere disruptions were present in 100% of control individuals and 100% of COPD patients (figure 4). However, both current smoking and presence of COPD associated with significant increases in both sarcolemmal and sarcomere injury (figure 5). Injury was increased not only in cases showing severe airflow obstruction but also in the mild or moderate stages of the disease. A statistically significant dose-response relationship (as assessed by linear correlation) was found between function of the muscle (as assessed by  $Q_{Tim}$ ) and both sarcolemmal and sarcomere disruptions ( $p < 0.05$ , both).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**DISCUSSION.**

The novel aspects of the present study can be summarized as four concepts. The first concept is that both sarcolemma and sarcomere disruptions are found in quadriceps samples from all healthy individuals, although low in prevalence. This finding supports the hypothesis that morphological signs of cell injury are involved in physiologic phenomena within normal muscle fibers (e.g., autophagy, damage/repair dynamics, apoptosis, etc). The second point deals with increased signs of sarcolemma and sarcomere disruptions in quadriceps from COPD patients. This is evident not only in patients with severe airflow obstruction but also in those in the mild or moderate stages of the disease. It supports the hypothesis that processes leading to quadriceps injury develop even in early stages of the disease. The third point deals with the coexistence of muscle injury and quadriceps dysfunction in COPD patients as expressed by decreased strength and lowered endurance during specific single-leg exercise. Consequently, muscle injury can be related (causally or not) to peripheral muscle dysfunction in COPD. Finally, the fourth point relates to the study design. We selected patients with stable COPD and excluded those with acute or chronic respiratory failure, hypercapnia, chronic steroid treatment, low body weight, or some coexisting disease. In consequence, the study allows us to suggest that susceptibility to muscle injury is increased in non-comorbid COPD patients and must be considered not to be exclusive in patients with advanced disease or coexistent diseases.

**Previous studies.** Quadriceps muscles show functional, morphological and metabolic changes in patients with COPD. Various descriptive studies consistently demonstrate that the presence of COPD associates with both decreased strength and endurance in the quadriceps muscles.<sup>19,21,22</sup> These changes have clinical relevance because quadriceps dysfunction is associated with decreased exercise capacity (e.g., decreased 6' walking

1  
2  
3  
4 distance and maximal oxygen uptake),<sup>16,21,23</sup> increased symptoms during general  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
distance and maximal oxygen uptake),<sup>16,21,23</sup> increased symptoms during general  
exercise<sup>21</sup> and a lower quality of life.<sup>24</sup>

Serres et al.<sup>11</sup> demonstrated a correlation between deconditioning and quadriceps  
fatigability in a group of COPD patients. However, muscle dysfunction is independent  
of the severity of the disease affecting even patients in the mild to moderate stages of  
the disease. Moreover, Coronell et al.<sup>19</sup> highlighted that quadriceps endurance is  
impaired even in absence of sedentarism, drugs, respiratory failure, or comorbidity.  
From a morphological point of view, quadriceps muscles show decreased muscle  
mass<sup>25,26</sup>, type I and type II fiber size,<sup>27</sup> myoglobin concentration,<sup>28,29</sup> and type I fiber  
proportions<sup>30-32</sup> in COPD patients. This I → II shift in fiber type is associated with early  
anaerobic metabolism during exercise<sup>33,34</sup> and low muscle oxygen uptake.<sup>35</sup> Capillary  
density,<sup>28</sup> proportion of type II fibers, and MyHC type II isoforms are increased.

From a metabolic point of view, the quadriceps of COPD patients consistently shows a  
decreased aerobic capacity (as assessed by citrate-synthase, succinil-dehydrogenase, and  
hydroxiacilCoA enzymes). Maltais et al.<sup>36</sup> showed an association between the  
concentration of aerobic enzymes in the quadriceps and oxygen uptake. However,  
cytochrome-oxidase (COX), the final step of oxidative phosphorylation, has been found  
to be increased<sup>37</sup> probably as a compensatory mechanism due to chronic or intermittent  
hypoxia.<sup>38</sup> In addition, mitochondria content was found to be normal in the muscle.<sup>28</sup>  
Some anaerobic enzyme activities remained normal (mainly lactate-dehydrogenate  
[LDH] and hexokinase [HK])<sup>36,39</sup>, although phosphofructokinase (FFK) activity appears  
to increase.<sup>39</sup>

**Quadriceps muscle injury.** The authors have been unable to find any previous study  
assessing peripheral muscle injury in patients with COPD. Signs of injury have been  
described in respiratory muscles from both healthy<sup>4</sup> and diseased individuals.<sup>3</sup>  
Diaphragm fiber injury has also been described after sudden infant death syndrome<sup>40</sup>

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

and fatal asthma.<sup>41</sup> In patients with COPD, MacGowan et al.<sup>3</sup> showed that increasing severity of airflow obstruction is associated with an increased area of abnormal diaphragm (i.e., injured muscle) and a decreased proportion of normal diaphragm as assessed by light microscopy techniques. Subcellular damage in diaphragms from both healthy volunteers and COPD patients has also been observed using electron microscopy studies.<sup>4</sup> These findings support that muscle injury is common in the human diaphragm, being more evident in COPD patients, and is higher after inspiratory loading especially in the diaphragm of those with COPD. Altogether, this data and the present study allow us to interpret that muscle injury affects both respiratory (diaphragm) and peripheral (vastus lateralis) muscles in COPD patients. This concept implies that factor(s) with systemic effects, not only increased mechanical loads, but is also involved in the injury of skeletal muscles associated with the disease. The cross-sectional design of the present study does not allow us to determine a causal-effect relationship of increased peripheral muscle injury and COPD. However, some possibilities will be briefly discussed below.

Muscle injury involves several mechanical and metabolic processes.<sup>42,43</sup> Numerous studies in both animal models and humans have shown that exertion can injure the limb muscles. However, additional factors should be brought up because it is generally assumed that COPD patients perform less daily activities than healthy age-matched controls.<sup>11</sup> Disrupted innervation or decreased neuromuscular activity can lead to changes in fiber types. Gosker et al.<sup>30</sup> indeed pointed towards a slightly more pronounced neurogenic atrophy in the quadriceps of COPD compared to healthy controls. However, no data is available on the innervation of peripheral muscles in COPD. Inactivity and unloading can reduce oxidative capacity and decreased fiber I proportion in quadriceps muscles, but it appears not to be related to muscle injury. An imbalance between protein synthesis and breakdown in favor of the latter could feasibly

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

increase muscle injury in COPD. Findings pointing towards the involvement of decreased muscle synthesis in muscle wasting have been reported for underweight patients with emphysema.<sup>44</sup> Oxidative stress and systemic inflammation may be possible factors involved in net protein loss and muscle injury. Enhanced oxidative stress probably occurs in the peripheral muscles of COPD patients. Protein oxidation by reactive oxygen species (ROS) leads to the formation of carbonyl groups of amino acid residues, thereby modifying the protein structure and/or chemical properties. These altered proteins are more susceptible to proteases or may be even be recognized as foreign substances thus being attacked by the immune system.<sup>45</sup> In addition, some studies suggest that oxidative stress can suppress protein synthesis in skeletal muscles of COPD patients.<sup>46,47</sup> During acute inflammatory mediated metabolic stress, a redistribution of the body's protein content occurs with the preferential depletion of skeletal muscle providing substrate and energy for acute phase protein synthesis in the liver and possibly in other tissues as well.<sup>48</sup> This process is tightly regulated by cytokines, of which TNF- $\alpha$  is important. An association between systemic inflammation especially reflected by the increased circulating levels of TNF $\alpha$  and the soluble TNF $\alpha$ -receptors and chronic muscle wasting has indeed been observed in COPD.<sup>49</sup> There is abundant evidence that the ubiquitin-proteasome pathway is responsible for most of the increased protein breakdown in various types of muscle atrophy.<sup>50</sup> Whether this is the case in subgroups of patients with COPD however needs to be examined. Interestingly in an animal model, it has been demonstrated that the administration of various inflammatory cytokines enhanced ubiquitin gene expression in skeletal muscle.<sup>51</sup> Oxidative damage to proteins also results in degradation through the ubiquitin-proteasome pathway.<sup>52</sup> It can therefore be speculated that oxidative stress and/or elevated levels of circulating inflammatory mediators trigger muscular protein breakdown in COPD. Alternatively, impaired regeneration of muscle fibers may be

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

involved in muscle damage as well. In normal conditions, replacement of damaged or diminished muscle fibers can be established by the proliferation of satellite cells into myoblasts, which subsequently differentiate into myocytes. Interestingly, Langen et al.<sup>47</sup> recently demonstrated impaired differentiation of myocytes after exposure to TNF $\alpha$  and the possible involvement of ROS. It can therefore be hypothesized that impaired muscle regeneration is involved in muscle fiber damage in COPD patients. Other potential factors can be muscle loading, disrupted innervation, or altered hormonal profiles. Altered hormonal profiles, especially of testosterone and thyroid hormone, may also influence fiber type proportions. Serum thyroid hormone levels are normal in COPD<sup>53</sup>, but hypogonadism has indeed been reported for COPD.<sup>54</sup> To what extent the observed hormonal changes influence muscle injury in COPD need to be further investigated.

**Potential clinical implications.** A better understanding of the biochemical, morphologic, and functional correlation of injured skeletal muscles will facilitate discrimination of how injury, fatigue, and weakness contribute to both respiratory and peripheral muscle dysfunction in COPD. In fact, muscle injury associates not only with loss of functional capacity of the muscle but it is also closely related to stimulation of complex reparative mechanisms. These mechanisms can induce adaptation to increased utilization and stress in skeletal muscles (i.e., training).<sup>55-57</sup> In order to optimize therapeutic interventions, a better understanding of these mechanisms and the patients that are most susceptible to peripheral muscle injury needs to be determined. A potential clinical implication associates with exercise testing, proper exercise technique, supervision, and optimal exercise prescription to optimize benefits and success of a training program for COPD patients. The single workout must then be designed reflecting these targeted program goals including the choice of exercises, order of exercise, amount of rest used between sets and exercises, number of repetitions and sets used for each exercise, and the intensity of each exercise. For progression, these

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

variables must then be varied over time and the exercise prescription altered to maintain or advance specific training goals and to avoid detrimental muscle injury.

**CONCLUSIONS.** This study demonstrates that both presence of COPD and current smoking is associated with increased injury of peripheral muscles. Quadriceps injury is evident in mild, moderate and severe stages of the disease despite absence of respiratory failure, hypercapnia, chronic steroid treatment, low body weight, or some coexisting disease. These findings support that cigarette smoking and other systemic factors with deleterious effect are acting on peripheral muscles of COPD patients increasing the susceptibility to fiber injury.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**TABLE LEGENDS.**

**TABLE 1.** All data are expressed as mean±SD unless otherwise indicated.

**Abbreviations:** (BMI): body mass index; (FEV<sub>1</sub>): forced expiratory volume at the 1<sup>st</sup> second; (FEV<sub>1</sub>/FVC): spirometric ratio; (TLC): total lung capacity; (DL<sub>CO</sub>): Diffusion capacity for CO; (PaO<sub>2</sub> and PaCO<sub>2</sub>): Partial arterial pressure for O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>, respectively; (a.u.): arbitrary units as in Voorrips et al.<sup>9</sup> (\*):p<0.05 COPD patients compared to controls; (\*\*): p<0.01 COPD patients compared to controls.

**TABLE 2.** Data are presented as mean±SD. **Abbreviations:** (Q<sub>MVC</sub>): quadriceps maximal strength during maximum voluntary contraction; (Q<sub>Tim</sub>): quadriceps endurance using normalized load (equivalent to 10% of the Q<sub>MVC</sub>), contraction frequency, static torque and dynamic torque. (\*): p<0.05 COPD patients compared to controls. (\*\*): p<0.01 COPD patients compared to controls.

**TABLE 3.** Data are presented as mean±SD. **Abbreviations:** (CSA): cross sectional area of muscle fibers.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**FIGURE LEGENDS**

**FIGURE 1.** Representative immunohistochemical staining of vastus lateralis biopsies from (A) a healthy non-smoker control individual, (B) a former-smoker COPD patient, and (C) a current-smoker COPD patient. Permeability of the cellular membrane to albumin is a sign of muscle membrane injury.<sup>17</sup> In these cases, immunocomplexes were detected using immunoperoxidase technique. Detail on the method for making these measurements is provided in an online data supplement.

**FIGURE 2.** Electron microscopy images showing both normal (A) and disrupted (B) sarcomere in vastus lateralis from a COPD patient. Part of two adjacent muscle fibers is illustrated. Elements of several sarcomere of adjacent myofibrils are affected by a change referred to as streaming (zigzag appearance) of the Z-line. Detail on the method and criteria for making these measurements is provided in an online data supplement.

**FIGURE 3.** Representative part of longitudinal sections (transmission electron microscopy) from quadriceps muscle fibers is illustrated. Figure (A) exhibits a normal structure in the vastus lateralis muscle from a non-smoker healthy control. Figures (B), (C) and (D) correspond to a sample of vastus lateralis obtained from a non-smoker COPD patient exhibiting degenerative changes of the myofibrils referred to as injury. Disarray (B), streaming (C) and loss (D) of myofibrils and Z-lines are illustrated. Distension of sarcoplasmic reticulum is also shown (D). Detail on the method and criteria for making these measurements is provided in an online data supplement.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**FIGURE 4.** Proportion (%) of fibers showing sarcolemmal injury (A) and abnormal area fraction of disrupted sarcomere (B) in different patient groups according to presence of COPD. Mean±SD are shown.

**FIGURE 5.** Proportion (%) of fibers showing sarcolemmal injury (A) and abnormal area fraction of disrupted sarcomere (B) in different patient groups according to two criteria: smoking and presence of COPD. Mean±SD are shown.

**FIGURE 6.** Proportion (%) of fibers showing sarcolemmal injury (A) and abnormal area fraction of disrupted sarcomere (B) in different patient groups according to severity of the disease according to GOLD classification. Mean±SD are shown.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**TABLE 1**  
**GENERAL CHARACTERISTICS OF THE STUDY POPULATION**

	STUDY GROUP	
	Healthy elderly controls	COPD patients
N	7	14
Age, years	69 ± 6	65 ± 7
BMI, kg/m <sup>2</sup>	26.4 ± 2.7	25.3 ± 5.5
FEV <sub>1</sub> , %pred	98 ± 15	42 ± 18**
FEV <sub>1</sub> /FVC, %	73 ± 4	48 ± 12**
TLC, %pred	99 ± 10	118 ± 31
DL <sub>CO</sub> , %pred	92 ± 22	71 ± 23
PaO <sub>2</sub> , mmHg	90 ± 9	68 ± 7**
PaCO <sub>2</sub> , mmHg	38 ± 5	45 ± 6**
Daily physical activity, a.u.	14 ± 8	12 ± 6

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**TABLE 2.**  
**STRENGTH AND ENDURANCE OF THE QUADRICEPS MUSCLE**

	STUDY GROUP	
	Healthy controls	COPD Patients
<b>Quadriceps strength</b>		
Q <sub>MVC</sub> , kg	35 ± 11	22 ± 11 *
Q <sub>MVC</sub> , %pred	85 ± 19	64 ± 20 *
<b>Quadriceps endurance</b>		
Q <sub>Tim</sub> , min.	28.1 ± 2.9	10.7 ± 6.0 **
Q <sub>Tim</sub> , %pred	94 ± 10	36 ± 20 **

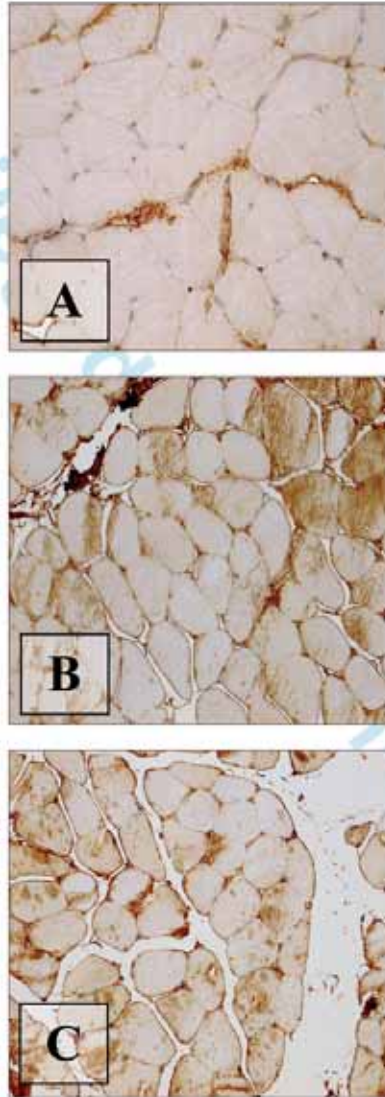
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**TABLE 3.**  
**CELLULAR CHARACTERISTICS OF QUADRICEPS MUSCLE**

	STUDY GROUP	
	Healthy controls	COPD patients
<b>Capillary density</b>		
Capillaries/mm <sup>2</sup>	266 ± 53	205 ± 75
Capillaries/fiber ratio	0.99 ± 0.19	0.96 ± 0.19
<b>Type I fibers</b>		
Proportion, %	33 ± 9	34 ± 11
CSA, μm	4137 ± 676	3265 ± 1646
Least diameter, μm	51 ± 12	52 ± 9
<b>Type II fibers</b>		
Proportion, %	67 ± 9	66 ± 11
CSA, μm	3482 ± 1234	3265 ± 1043
Least diameter, μm	49 ± 11	51 ± 10

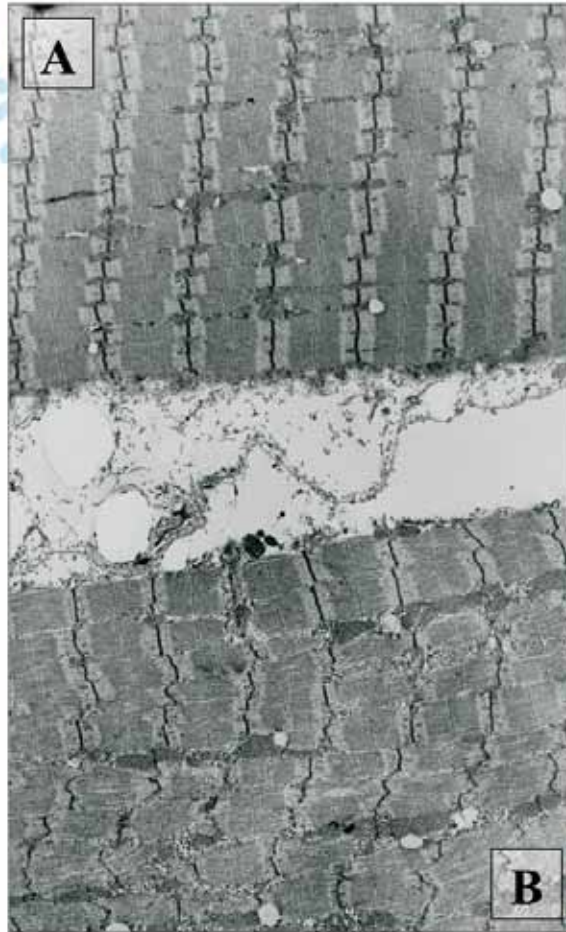
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Figure 1**



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

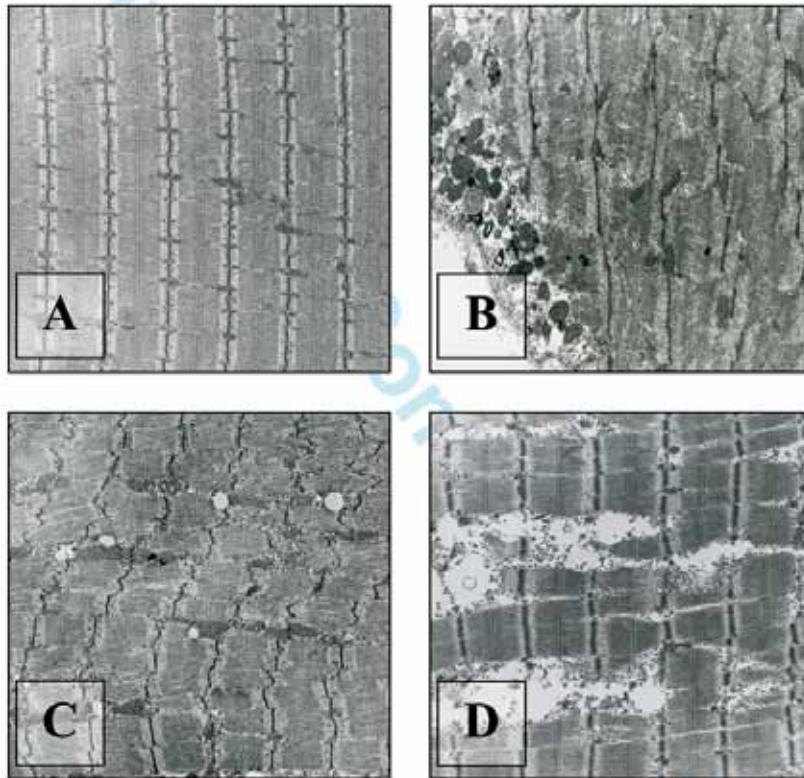
**Figure 2**

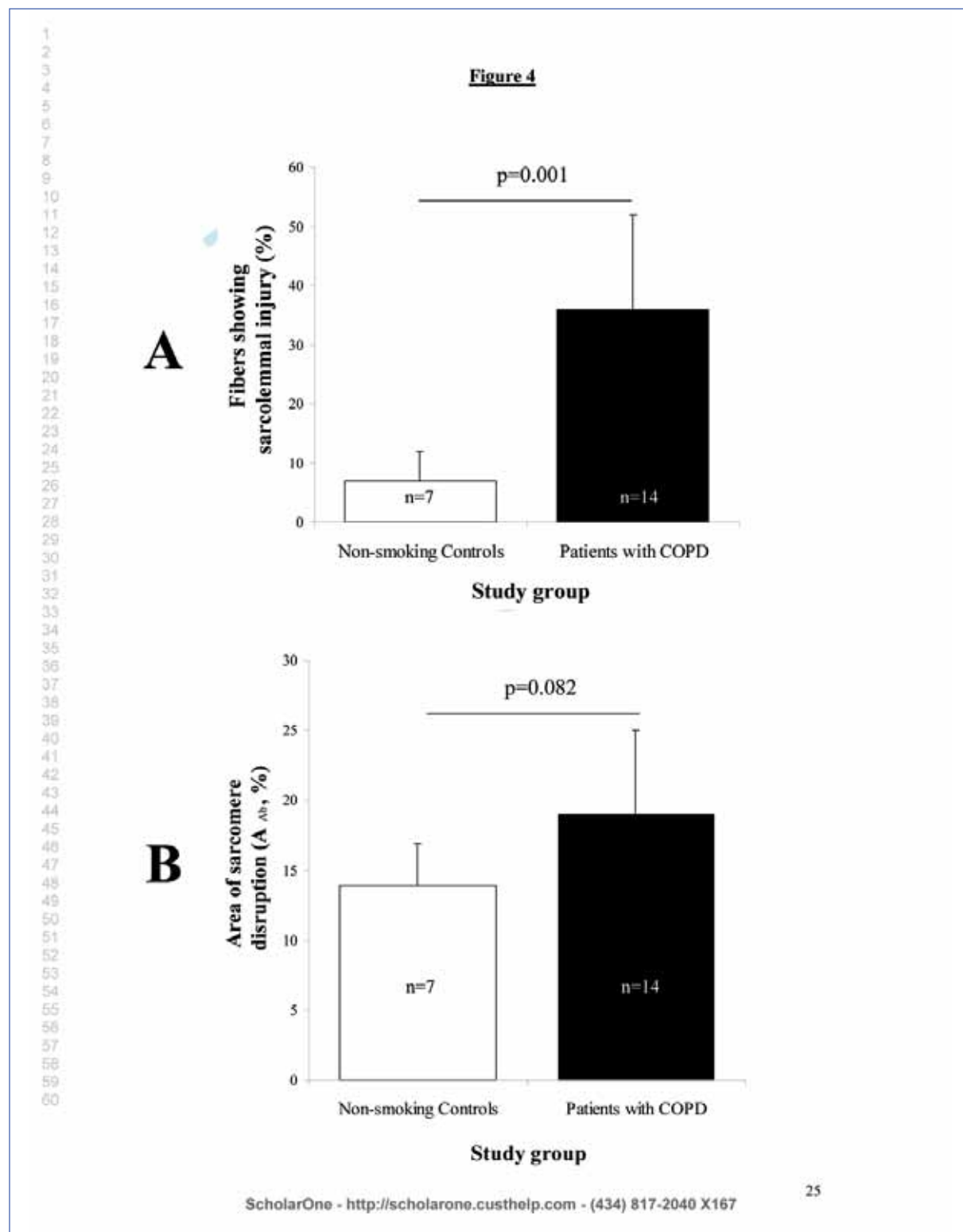




1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

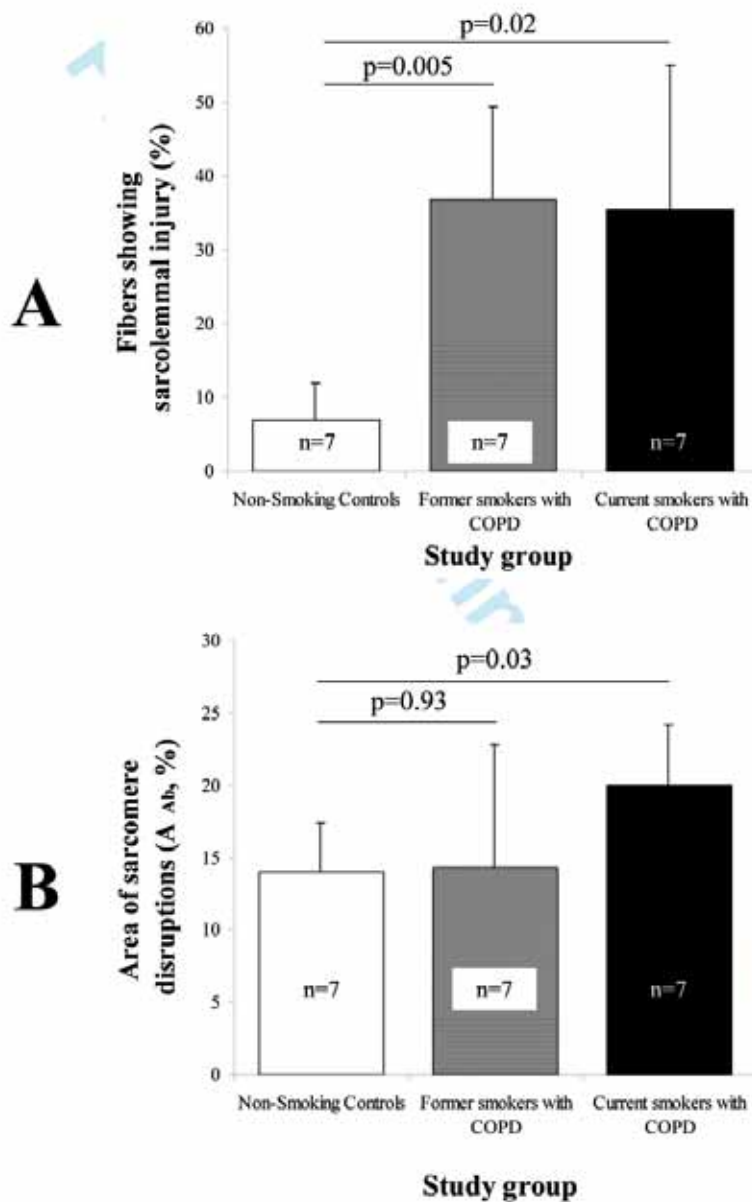
**Figure 3**

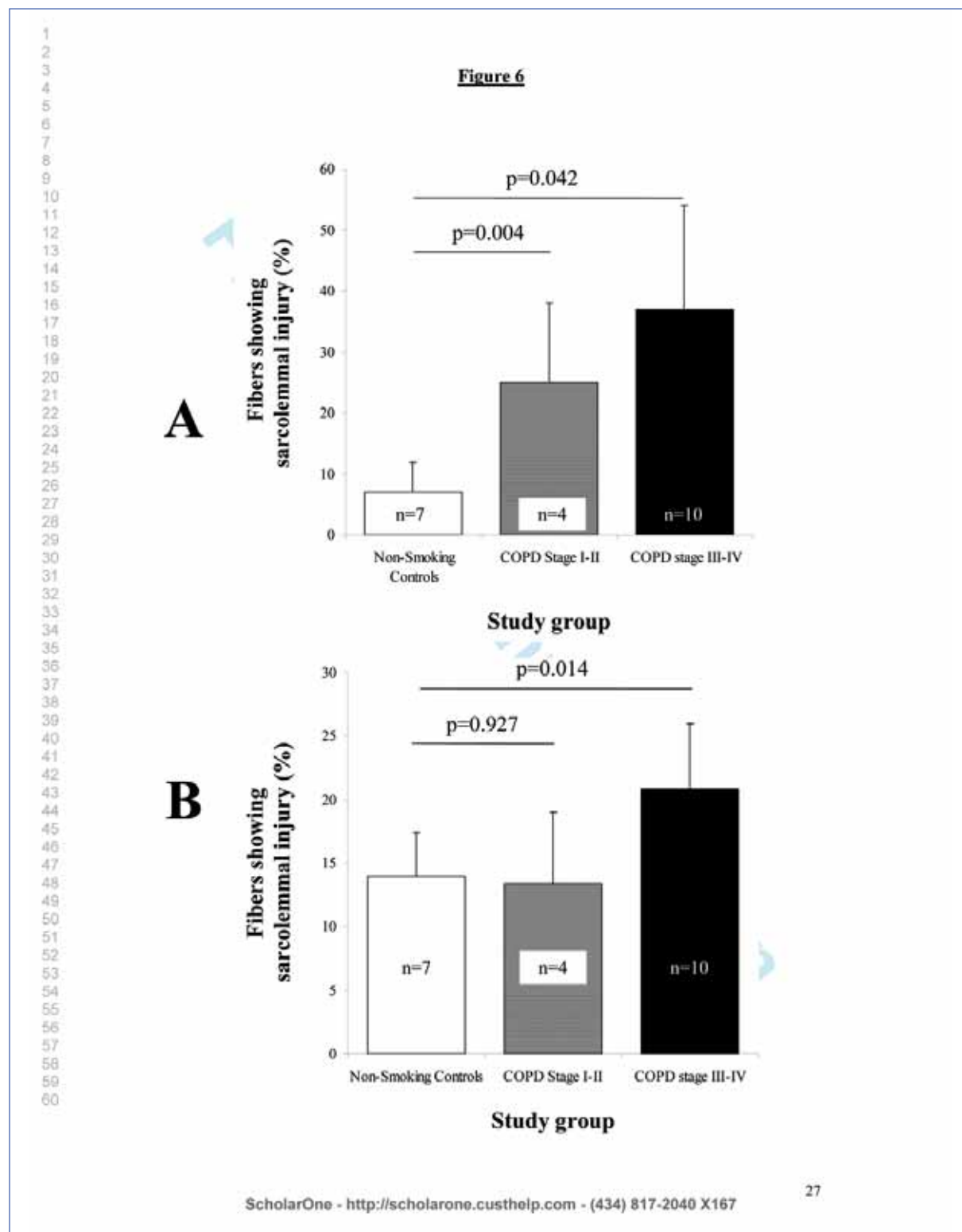




1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Figure 5**





**REFERENCES**

- 1 Friden J, Sjoström M, Ekblom B. Myofibrillar damage following intense eccentric exercise in man. *Int J Sports Med* 1983; 4:170-176
- 2 Reid WD, MacGowan NA. Respiratory muscle injury in animal models and humans. *Mol Cell Biochem* 1998; 179:63-80
- 3 MacGowan NA, Evans KG, Road JD et al. Diaphragm injury in individuals with airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1654-1659
- 4 Orozco-Levi M, Lloreta J, Minguella J et al. Injury of the human diaphragm associated with exertion and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1734-1739
- 5 Jiang TX, Reid WD, Belcastro A et al. Load dependence of secondary diaphragm inflammation and injury after acute inspiratory loading. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:230-236
- 6 Celli BR, MacNee W. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 2004; 23:932-946
- 7 Baecke JA, Burema J, Frijters JE. A short questionnaire for the measurement of habitual physical activity in epidemiological studies. *Am J Clin Nutr* 1982; 36:936-942
- 8 Couillard A, Koechlin C, Cristol JP et al. Evidence of local exercise-induced systemic oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Eur Respir J* 2002; 20:1123-1129
- 9 Voorrips LE, Ravelli AC, Dongelmans PC et al. A physical activity questionnaire for the elderly. *Med Sci Sports Exerc* 1991; 23:974-979
- 10 Bink B, Bonjer H, Van Der Sluys H. Assessment of the energy expenditure by indirect time and motion study. In: Edang K, Lange Andersen K, Eds. *Physical activity in health and disease. Proceedings of the Bertostølen Symposium*, Oslo, Oslo University. 1996: 207-214.
- 11 Serres I, Gautier V, Varray A et al. Impaired skeletal muscle endurance related to physical inactivity and altered lung function in COPD patients. *Chest* 1998; 113:900-905
- 12 Roca J, Sanchis J, Agustí-Vidal A et al. Spirometric reference values from a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1986; 22:217-224
- 13 Roca J, Burgos F, Barbera JA et al. Prediction equations for plethysmographic lung volumes. *Respir Med* 1998; 92:454-460

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 14 Roca J, Rodriguez-Roisin R, Cobo E et al. Single-breath carbon monoxide diffusing capacity prediction equations from a Mediterranean population. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141:1026-1032
- 15 Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (2005). Available at: <http://www.goldcopd.com/Guidelineitem.asp?H=2&I=1&intId=989> Accessed November 14, 2005
- 16 Ramirez-Sarmiento A, Orozco-Levi M, Guell R et al. Inspiratory muscle training in patients with chronic obstructive pulmonary disease: structural adaptation and physiologic outcomes. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:1491-1497
- 17 Straub V, Rafael JA, Chamberlain JS et al. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. *J Cell Biol* 1997; 139:375-385
- 18 Orozco-Levi M, Gea J, Lloreta JL et al. Subcellular adaptation of the human diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999; 13:371-378
- 19 Coronell C, Orozco-Levi M, Mendez R et al. Relevance of assessing quadriceps endurance in patients with COPD. *Eur Respir J* 2004; 24:129-136
- 20 Schelesselman J. Case-control studies: design, conduct and analysis. New York: Oxford University Press. 1982
- 21 Agusti AG, Noguera A, Sauleda J et al. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 21:347-360
- 22 Hamilton AL, Killian KJ, Summers E et al. Muscle strength, symptom intensity, and exercise capacity in patients with cardiorespiratory disorders. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:2021-2031
- 23 Troosters T, Gosselink R, Rollier H et al. Change in lower limb muscle strength contributes to altered six minute walking distance in COPD. *Eur Respir J* 1996; 9: S144
- 24 Simpson K, Killian K, McCartney N et al. Randomised controlled trial of weightlifting exercise in patients with chronic airflow limitation. *Thorax* 1992; 47:70-75
- 25 Schols AM, Wouters EF, Soeters PB et al. Body composition by bioelectrical-impedance analysis compared with deuterium dilution and skinfold anthropometry in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr* 1991; 53:421-424
- 26 Wuyam B, Payen JF, Levy P et al. Metabolism and aerobic capacity of skeletal muscle in chronic respiratory failure related to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1992; 5:157-162

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 27 Hughes RL, Katz H, Sahgal V et al. Fiber size and energy metabolites in five separate muscles from patients with chronic obstructive lung diseases. *Respiration* 1983; 44:321-328
- 28 Simard C, Maltais F, Leblanc P et al. Mitochondrial and capillarity changes in vastus lateralis muscle of copd patients: electron microscopy study. *Med Sci Sports Exerc* 1996; 28:-95
- 29 Whittom F, Jobin J, Simard PM et al. Histochemical and morphological characteristics of the vastus lateralis muscle in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Med Sci Sports Exerc* 1998; 30:1467-1474
- 30 Gosker HR, Kubat B, Schaart G et al. Myopathological features in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 22:280-285
- 31 Hildebrand IL, Sylven C, Esbjornsson M et al. Does chronic hypoxaemia induce transformations of fibre types? *Acta Physiol Scand* 1991; 141:435-439
- 32 Satta A, Migliori GB, Spanevello A et al. Fibre types in skeletal muscles of chronic obstructive pulmonary disease patients related to respiratory function and exercise tolerance. *Eur Respir J* 1997; 10:2853-2860
- 33 Casaburi R, Patessio A, Ioli F et al. Reductions in exercise lactic acidosis and ventilation as a result of exercise training in patients with obstructive lung disease. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143:9-18
- 34 Patessio A, Casaburi R, Carone M et al. Comparison of gas exchange, lactate, and lactic acidosis thresholds in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:622-626
- 35 Evans AB, Al Himyary AJ, Hrovat MI et al. Abnormal skeletal muscle oxidative capacity after lung transplantation by 31P-MRS. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:615-621
- 36 Maltais F, Simard AA, Simard C et al. Oxidative capacity of the skeletal muscle and lactic acid kinetics during exercise in normal subjects and in patients with COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:288-293
- 37 Sauleda J, Garcia-Palmer F, Wiesner RJ et al. Cytochrome oxidase activity and mitochondrial gene expression in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1413-1417
- 38 Lundgren F, Dahllof AG, Schersten T et al. Muscle enzyme adaptation in patients with peripheral arterial insufficiency: spontaneous adaptation, effect of different treatments and consequences on walking performance. *Clin Sci (Lond)* 1989; 77:485-493
- 39 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; 151:374-377

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 40 Kariks J. Diaphragmatic muscle fibre necrosis in SIDS. *Forensic Sci Int* 1989; 43:281-291
- 41 Silver MM, Smith CR. Diaphragmatic contraction band necrosis in a perinatal and infantile autopsy population. *Hum Pathol* 1992; 23:817-827
- 42 Armstrong RB. Initial events in exercise-induced muscular injury. *Med Sci Sports Exerc* 1990; 22:429-435
- 43 MacIntyre DL, Reid WD, McKenzie DC. Delayed muscle soreness. The inflammatory response to muscle injury and its clinical implications. *Sports Med* 1995; 20:24-40
- 44 Morrison WL, Gibson JN, Scrimgeour C et al. Muscle wasting in emphysema. *Clin Sci (Lond)* 1988; 75:415-420
- 45 Dean RT, Fu S, Stocker R et al. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997; 324 ( Pt 1):1-18
- 46 Buck M, Chojkier M. Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in a murine model of cachexia is prevented by inhibitors of nitric oxide synthesis and antioxidants. *EMBO J* 1996; 15:1753-1765
- 47 Langen RC, Schols AM, Kelders MC et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenesis through redox-dependent and -independent pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283:C714-C721
- 48 Kotler DP. Cachexia. *Ann Intern Med* 2000; 133:622-634
- 49 Eid AA, Ionescu AA, Nixon LS et al. Inflammatory response and body composition in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1414-1418
- 50 Jagoe RT, Goldberg AL. What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2001; 4:183-190
- 51 Llovera M, Carbo N, Lopez-Soriano J et al. Different cytokines modulate ubiquitin gene expression in rat skeletal muscle. *Cancer Lett* 1998; 133:83-87
- 52 Tsigotis M, Zhang M, Chiu RK et al. Sensitivity of mammalian cells expressing mutant ubiquitin to protein-damaging agents. *J Biol Chem* 2001; 276:46073-46078
- 53 Dimopoulou I, Ilias I, Mastorakos G et al. Effects of severity of chronic obstructive pulmonary disease on thyroid function. *Metabolism* 2001; 50:1397-1401
- 54 Kamischke A, Kemper DE, Castel MA et al. Testosterone levels in men with chronic obstructive pulmonary disease with or without glucocorticoid therapy. *Eur Respir J* 1998; 11:41-45
- 55 McNeil PL, Ito S. Molecular traffic through plasma membrane disruptions of cells in vivo. *J Cell Sci* 1990; 96 ( Pt 3):549-556



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 56 Mehiri SN, Barreiro E, Hayot M et al. Time-based gene expression programme following diaphragm injury in a rat model. *Eur Respir J* 2005; 25:422-430
- 57 Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH et al. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:3710-3714

Privileged Communication

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Online repository material**

**Manuscript:**  
**Injury of peripheral muscles in susceptible smokers with Chronic Obstructive Pulmonary Disease.**

**Authors:** Carlos Coronell, Alba Ramirez-Sarmiento, Josep Lloreta, Juana Martínez-Llorens, Juan B. Galdiz, Joaquim Gea, Mauricio Orozco-Levi on behalf of the ENIGMA in COPD group.

Privileged Communication

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## **METHODS.**

### **ONLINE REPOSITORY MATERIAL.**

**Muscle biopsies and sample processing.** Biopsies from the vastus lateralis were taken at middle of the thigh (approximately 15-cm above the patella) as described elsewhere.<sup>1</sup> The size of the muscle sample was approximately 8 x 8 x 8 mm. Specimens were first dissected free of visible connective tissue and fat and the remaining muscle tissue was quick-frozen in isopentane cooled to freezing point with liquid nitrogen and stored at -70°C until analysis. Ten micrometer-thick sections were cut varying the inclination of the holder by 5 degree increments until the minimum cross-sectional area was obtained, which was defined as truly transverse.<sup>2,3</sup> Each biopsy was divided into two blocks, one of them was processed by immunohistochemical techniques using monoclonal antibodies directed against myosin heavy chain (MyHC) isoforms type I and type II (MHCs and MHCf clones; Biogenesis, New Fields, Poole, UK). The cross-sectional area, mean least diameter, and proportions of type I and -II fibers were assessed using a light microscope (Olympus, Series AX70TF; Olympus Optical Co., Shinjukuku, Tokyo, Japan) coupled with an image-digitizing camera (View Finder Lite; Version 1.0.143c; Pixera Co., Los Gatos, CA) and an morphometry program (Scion Image, Version Beta 4.0.2; Scion Co., Frederick, MD, USA). A total of 125±41 (range, 56-179) fibers were measured in the biopsies. Fiber diameters between 40 and 80 µm were considered normal.<sup>2,4,5</sup>

For assessment and quantification of muscle injury we chose two non-redundant (complimentary) methods based on light and electron microscopy. For the former, one part of each sample was processed for immunohistochemical techniques using a

1  
2  
3  
4 polyclonal rabbit anti-human antibody directed against albumin (Code No. A0001;  
5 DakoCytomation, DK-2600 Glostrup, Denmark) as a primary antibody. Increase  
6 permeability of the cellular membrane to albumin is a sign of membrane injury.<sup>6</sup> This  
7 immunocomplex was detected using a horse-radish peroxidase-labeled goat anti-rabbit  
8 secondary antibody (Code No. K4003; EnVision+ System-HRP labeled polymer, Dako  
9 Co., Carpinteria, CA, USA) The reaction was developed with a chromogen solution  
10 with 3,3-diaminobenzidine (Code No. K3468; Liquid DAB+ Substrate-Chromogen  
11 Solution, Dako Co., Carpinteria, CA, USA). The analysis of intracellular albumin was  
12 performed in duplicate (double-blind approach) using a categorical scale (0-3). The  
13 mean value obtained by the two observers was used for the statistical analysis.  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26

27 The second part of each muscle biopsy was processed to evaluate signs of  
28 subcellular muscle injury through electron microscopy. Muscle samples were processed  
29 according to semiautomatic methods (Tissue Processor E9200; BioRad, Watford, UK)  
30 as has been described elsewhere.<sup>7</sup> Microphotographs of the muscle samples were taken  
31 from 16 randomly selected fields at constant calibrated magnification (X1900) using a  
32 transmission electron microscope (CM100; Philips, Amsterdam, The Netherlands). An  
33 accelerating voltage of 60 kV was used. Disrupted sarcomere were evaluated as a sign  
34 of muscle injury and defined as a zone with distinct distortion of the usual sarcomere  
35 architecture, defined by the following six criteria: discontinuity of a group of  
36 myofibrils, A- and I-band disruption, Z-band streaming, embedded sub cellular  
37 components (mitochondria or collagen), preserved adjacent sarcomere, and absence of  
38 regional sectioning artifacts (scratches, holes, or chatters). To quantify the injury, both  
39 density (i.e., number of areas containing disrupted sarcomere, expressed as) and  
40 proportion (i.e., abnormal area fraction, expressed as percentage) of disrupted sarcomere  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
were normalized to the micrographed area. To control a potential contraction artifact, the contraction index of individual sarcomere was calculated.<sup>7</sup>

**Quadriceps muscle function: strength and endurance.** Function of the dominant quadriceps muscle was evaluated after two weeks of the biopsy procedure. Both muscle strength and endurance of the dominant leg were evaluated during specific (local) single leg exercises at an exercise bench. Additional detail on the method for making these measurements is provided in an online data supplement.

Specifically, the strength of the muscle was assessed through isometric maximum voluntary contraction ( $Q_{MVC}$ ) of the dominant lower limb while the patients were seated with both trunk and thigh fixed on a rigid support of an exercise platform (Domyos HGH 050; Decathlon, Lille, France). Strength was quantified by an isometric dynamometer (TSD121C; Biopac Systems Inc., Santa Barbara, CA, USA) connected to a digital polygraph (MP100 A; Biopac Systems Inc., Santa Barbara, CA, USA). The highest value from three brief (3 s) reproducible  $Q_{MVC}$  maneuvers (<5% variability between values) was included in the analysis. The reference values included were those from Decramer et al.<sup>8</sup> Endurance of the quadriceps was assessed following a method described previously.<sup>9</sup> Briefly, the subjects performed intermittent knee extensions on the exercise platform. Axis of rotation, range of displacement and point of distal attachment were identical for all individuals. Contraction pattern was normalized at a frequency of 12 extensions per min, against an external load equivalent to 10%  $Q_{MVC}$ . The contraction cycling was imposed by using a digital audio signal (Joggler Plus 4.8.1; Leepoware, San José, CA, USA). Task failure was defined by one of two criteria. First, the inability to maintain leg extension equivalent to  $\geq 80\%$  of the maximum extension during three consecutive contractions, and secondly, the inability to continue the

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

exercise due to invalidating symptoms. The exercise was finished if the volunteers reached a  $Q_{Tim}$  of 30 min without succumbing to task failure. Heart rate and pulse oxymetry were recorded using a pulseoxymeter (MM205; Medical Artema Bd, Sundbyberg, Sweden). This analysis of sarcomere disruption was performed in duplicate using a double-blind approach. The mean value obtained by the two observers was used for the statistical analysis.

Privileged Communication

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

#### REFERENCES

- 1 Ramirez-Sarmiento A, Orozco-Levi M, Guell R et al. Inspiratory muscle training in patients with chronic obstructive pulmonary disease: structural adaptation and physiologic outcomes. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:1491-1497
- 2 Dubowitz V, Brooke MH. Muscle biopsy: a modern approach. En: major problems in neurology. V. Dubowitz y MH. Brooke Eds. London: Saunders. 1973; 74-85
- 3 Poole DC, Lieber RL, Mathieu-Costello O. Myosin and actin filament lengths in diaphragms from emphysematous hamsters. *J Appl Physiol* 1994; 76:1220-1225
- 4 Brooke MH, Engel WK. The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types. I. Adult male and female. *Neurology* 1969; 19:221-233
- 5 Hards JM, Reid WD, Pardy RL et al. Respiratory muscle fiber morphometry. Correlation with pulmonary function and nutrition. *Chest* 1990; 97:1037-1044
- 6 Straub V, Rafael JA, Chamberlain JS et al. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. *J Cell Biol* 1997; 139:375-385
- 7 Orozco-Levi M, Gea J, Lloreta JL et al. Subcellular adaptation of the human diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999; 13:371-378
- 8 Decramer M, Lacquet LM, Fagard R et al. Corticosteroids contribute to muscle weakness in chronic airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:11-16
- 9 Coronell C, Orozco-Levi M, Mendez R et al. Relevance of assessing quadriceps endurance in patients with COPD. *Eur Respir J* 2004; 24:129-136

## Estudio 4

# UPREGULATION OF PROINFLAMMATORY CYTOKINE GENES IN EXTERNAL INTERCOSTAL MUSCLES OF COPD PATIENTS

*Enviado a revisión al Eur Respir J, 2006.*

---

### HIPÓTESIS DEL ESTUDIO

Hipótesis nula ( $H_0$ ): Los músculos respiratorios de pacientes con EPOC muestran signos de daño celular. La presencia y gravedad de este daño celular no están relacionadas con el balance anabólico-catabólico de mediadores inflamatorios sobre la estructura muscular respiratoria.

Hipótesis Alternativa ( $H_1$ ): La presencia y gravedad del daño de los músculos respiratorios de pacientes con EPOC están relacionadas con el balance anabólico-catabólico de mediadores inflamatorios sobre la estructura muscular respiratoria.

### Objetivo general:

Determinar la presencia y concentración de mediadores inflamatorios (tanto a nivel de transcripción del gen respectivo a nivel de ácido ribonucleico mensajero [ARNm] como de expresión de la proteína) en músculos respiratorios de pacientes con EPOC y estimar su eventual relación tanto con la gravedad de la enfermedad como con la función y daño celular musculares.

### Objetivos específicos:

- Cuantificar la presencia y concentración de factores anabólicos (i.e. IL-10) y catabólicos (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) en los músculos inspiratorios (i.e. intercostales externos) de pacientes con EPOC, evaluados según transcripción del gen y expresión de la proteína, y compararlos con individuos sanos apareados por género, edad y estado nutricional.
- Evaluar la eventual correlación dosis-respuesta entre la gravedad de la enfermedad y la regulación de la expresión de factores anabólicos y/o catabólicos en los músculos respiratorios de pacientes con EPOC.
- Determinar la relación que puede existir entre la concentración de mediadores inflamatorios en los músculos inspiratorios de pacientes con EPOC, con la fuerza y resistencia ante pruebas específicas de ejercicio.
- Estimar la relación que puede existir entre la presencia y concentración de factores inflamatorios con el daño celular de los músculos respiratorios de pacientes con EPOC.



**UPREGULATION OF PROINFLAMMATORY CYTOKINE GENES IN  
THE EXTERNAL INTERCOSTAL MUSCLES OF COPD PATIENTS.**

CARME CASADEVALL, CARLOS CORONELL\*, ALBA L. RAMÍREZ-SARMIENTO,  
JUANA MARTÍNEZ-LLORENS, ESTHER BARREIRO, MAURICIO OROZCO-LEVI,  
JOAQUIM GEA, on behalf of the *ENIGMA in COPD* group.

Muscle & Respiratory System Research Unit (URMAR), *Servei de Pneumologia, Hospital  
del Mar - IMIM. Dpt. CEXS, Universitat Pompeu Fabra. Barcelona, Catalonia, Spain.*

(\*) Carme Casadevall and Carlos Coronell share the position of first author.

*This study was funded in part by QLRT-2000-00417 (PENAM project), QLRT-2001-02285  
(ENIGMA project) & RTIC C03/11 (Red RESPIRA - ISCIII).*

The Corresponding Author has the right to grant on behalf of all authors and does grant on behalf of all authors, an exclusive licence (or non exclusive for government employees) on a worldwide basis to the BMJ Publishing Group Ltd and its Licensees to permit this article (if accepted) to be published in [THORAX] editions and any other BMJPG Ltd products to exploit all subsidiary rights, as set out in our licence.

**KEY WORDS.** Cytokines - respiratory muscles - lung disease - muscle function.

**RUNNING HEAD.** COPD, cytokines and muscles

**Body of the manuscript word count:** 3,423

**Mail address:** Joaquim Gea, M.D.

Muscle & Respiratory System Research Unit (URMAR)

IMIM - Hospital del Mar, c/ Doctor Aiguader 80,

E-08003 Barcelona, SPAIN

Tel: (+34) 93 248 3138

Fax: (+34) 93 221 3237

E-mail: [jgea@imim.es](mailto:jgea@imim.es)

**ABSTRACT (Abstract word count: 247)**

**Background:** Muscle dysfunction is a characteristic feature of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). Recent studies suggest that cytokines may operate as regulators of skeletal muscle function and remodelling via autocrine/paracrine actions. The aim of this study was to characterise the local expression of different cytokines potentially involved in muscle dysfunction in a typical respiratory muscle of COPD patients.

**Methods:** External intercostal muscle biopsies were obtained both from 25 male patients with stable COPD and 6 healthy controls of comparable age. Local TNF-alpha, IL-1 beta, IL-6 and IL-10 expressions (reverse transcriptase - real-time polymerase chain reaction, RT-PCR, and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) and sarcolemmal damage (immunohistochemistry) were assessed.

**Results:** Muscle TNF-alpha and IL-6 gene expressions (mRNA level) were significantly higher in COPD patients compared to control subjects ( $p < 0.01$  both), and IL-1 beta showed a tendency in the same direction. Similar results were observed at the protein level. Sarcolemmal damage showed a tendency to be higher in the muscles of COPD patients. Significant moderate correlations were found between either TNF-alpha or IL-6 mRNA levels and FEV<sub>1</sub> in the overall population ( $p < 0.05$  both). Respiratory muscle function was impaired in COPD patients, and it correlated to the severity of lung function impairment. Moreover, in those patients with FEV<sub>1</sub> lower than 40% pred., respiratory muscle function was also related to the expression of TNF-alpha in the intercostal muscle ( $p < 0.01$ ).

**Conclusions:** COPD is associated with upregulation of proinflammatory cytokines in respiratory muscles. This upregulation might play a role in respiratory muscle dysfunction.

## **INTRODUCTION**

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterised by chronic airflow obstruction [1]. It is, however, a heterogeneous syndrome which, in addition to the classical involvement of lung parenchyma and airways, appears to be associated with a number of systemic manifestations. These include nutritional abnormalities, reduction of lean mass and muscle dysfunction [2]. Central to this is the role that respiratory muscles play, since they represent the active component of the ventilatory pump. In COPD, respiratory muscles have to cope with increased workloads, mechanical disadvantages related to hyperinflation and, as recently demonstrated, an intrinsic reduction in their contractile properties [3]. All these factors contribute to the impairment of the respiratory muscle capacity detected in these patients [4]. Despite a general consensus regarding this issue and its clinical consequences, little is known about the underlying pathogenic mechanisms that lead to impairment of the intrinsic contractile properties of respiratory muscles. A growing amount of data, however, supports the involvement of cytokines and oxidative stress in the pathogenesis of muscle weakness in different conditions including COPD [4]. Both loss of muscle mass and reduced strength have been attributed to changes in systemic cytokine levels such as those of TNF-alpha, IL-1 beta and IL-6 [5,6]. Nevertheless, the presence of differences in the severity of muscle weakness among muscle groups in stable COPD patients [7] indicates that, in addition to systemic factors, the process is probably regulated by intrinsic factors of the muscles themselves. Recent studies indicate that skeletal muscle is capable of synthesising a variety of cytokines [8-10] and that these cytokines could act as endogenous mediators of muscle dysfunction and/or adaptation via autocrine /paracrine effects [11]. In the light of all of this, we hypothesised that the intensity of muscle activity might induce the upregulation of local proinflammatory cytokines in COPD, and that this

increase in their expression may contribute to the pathogenesis of respiratory muscle weakness. Alternatively (or perhaps complementarily), the expression of these cytokines may play a role in the adaptive mechanisms which coexist with such functional muscle impairment. In both cases, local cytokine expression may also account for differences previously observed in the phenotype and function of different muscle groups in COPD [12-14]. Therefore, the purpose of the present study was to characterise the cytokine expression profile of a typical respiratory muscle in COPD patients.

#### **METHODS**

**Subjects.** Twenty-five clinically stable COPD patients and 6 healthy subjects of similar age were included. While patients were consecutively recruited from our outpatient clinics, control subjects were shared with another study aimed at describing the effects of ageing. GOLD criteria were used to define COPD [15], whereas stability was defined as the absence of exacerbations within three months before study entry. To eliminate gender-related effects, only males were included. Subjects with chronic respiratory failure, metabolic diseases, cardiovascular problems, concomitant respiratory disorders, or treatments with drugs known to modify muscle structure or function were excluded. The study was approved by the institutional Ethics Committee and written informed consent was obtained from all individuals.

**Functional evaluations.** Lung and respiratory muscle function were assessed using conventional techniques. Briefly, forced spirometry with bronchodilator response (Datospir 92, Sibel, Barcelona, Spain) as well as intrathoracic gas volume, airway resistance and carbon monoxide diffusing capacity of the lung (Masterlab, Jaeger, Würzburg, Germany) were measured in each individual. Blood samples were obtained from the radial artery of

the non-dominant arm and blood gas pressures were measured by conventional polarographic techniques (RapidLab 860 Bayer HealthCare, Berkshire, UK). The strength of respiratory muscles was determined by measuring maximal respiratory pressure generated at the mouth during forced inspiratory (MIP) and expiratory (MEP) efforts performed against an occluded airway from residual volume (RV) and total lung capacity (TLC), respectively [16]. Reference values were those appropriate for a Mediterranean population [17-20]. Inspiratory muscle resistance was in turn assessed during two different threshold inspiratory tests. The first was an incremental test, whereby patients and volunteers breathed against progressive loads (approximately, +8 cm H<sub>2</sub>O every 2 minutes) until maximal inspiratory sustainable threshold pressure (P<sub>thmax</sub>) was reached [16] [21]. In the second test, subjects breathed against a submaximal constant load (80% of the P<sub>thmax</sub>) until exhaustion [16]. The period that elapsed was defined as the endurance time (T<sub>th80</sub>).

**Biopsies.** Samples from the external intercostal muscles were taken from the anterior axillary line at the sixth intercostal space as previously described [16].

**RNA isolation, Reverse Transcription and real-time PCR.** Total RNA was extracted from skeletal muscle using TRIzol reagent (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA USA). Following quantification of total RNA, one µg was reverse transcribed using oligo(dT)<sub>12-18</sub> primer and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Life Technologies). cDNA synthesis was performed in a GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer, Richmond, CA, USA), and an aliquot was used for real-time PCR amplification. This was performed with the ABI PRISM 7900HT Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Predeveloped TaqMan Assays were used to quantify TNF-alpha, IL-1 beta, IL-6 and IL-10 gene expression (Assays-on-Demand Gene

Expression Products, Applied Biosystems). Beta-actin gene was used as the endogenous control (*housekeeping*). Primers for cytokine and *housekeeping* genes appear in table 1. TaqMan<sup>®</sup> MGB probes were labelled at the 5' end with the reporter dye molecule 6-FAM (6-carboxy-fluorescein) and at the 3' end with a non-fluorescent quencher (NFQ).

Samples were always assayed in triplicate and the average value was taken (intra-assay variability coefficients, 0.3 to 3.3 %). The PCR mixture was incubated 2 min at 50° C for AmpErase uracil-N-glycosylase-mediated decontamination, followed by 10 min at 95° C to activate AmpliTaq Gold DNA polymerase. Subsequently, a total of 50 cycles were performed; these consisted of a denaturation step for 15 sec. at 95° C and a combined annealing-extension step for 1 min at 60° C. Data were analysed with the Sequence Detector software (SDS). The standardised target gene was compared with an external reference (i.e. a cDNA that was used in every assay). The relative copy number was calculated according to the comparative threshold cycle ( $C_T$ ) method [22].

**Protein level.** The cytokine contents were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a commercial kit which includes monoclonal antibodies against human TNF- $\alpha$ , IL-1 beta, IL-6 and IL-10, using the standard procedure recommended in the manufacturer's instructions (Amersham Pharmacia Biotech Limited, Buckinghamshire, UK). Briefly, 200  $\mu$ l of the sample were added to each well for a final dilution of 1:0.35. The microplates were then incubated for 3 h at room temperature (RT), and subsequently washed 6 times with 400  $\mu$ l of the appropriate buffer. Then 200  $\mu$ l of the cytokine polyclonal antibody were added to each well, and incubated for 2 h at RT. Washes were then repeated and 50  $\mu$ l of the substrate solution were added to each well and incubated for one h at RT. Immediately after that, 50  $\mu$ l of the amplifier solution were added and the

mixture was again incubated for 30 min at RT. The process was stopped using a specific solution, and the absorbance of each well was determined (Multiskan MS reader, Labsystems, Vantaa, Finland).

**Sarcolemmal damage.** The muscle section was stained with monoclonal antibodies against albumin (Research Diagnostics Inc, Flanders, NJ, USA) and the binding was visualised using the biotin-streptavidin-peroxidase technique (AB600, IC019, The Binding Site, Birmingham, UK), and developed with 3-3'-diaminobenzidine (DAB, D5337, Sigma, St Louis, MIS, USA). Tissue was then observed under light microscopy and the image was digitalised (Pixera Studio 1.2, Visual Communication System, Pixera Corporation, Los Gatos, CA, USA). Those fibres showing immunopositivity for intrafibrillar albumin were identified and the percentage of positive cells was determined [23]. At least 100 fibres were evaluated by two independent and well-trained observers in each case. These observers were blind with respect to sample identification. The edges of the section as well as areas with artifacts were excluded from the analysis.

**Statistical analyses.** Values are expressed as mean  $\pm$  SD. The normality of the distribution for each variable was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test, and analysis of differences was done with the t-test for unpaired data. The relationships between different variables were assessed using the Pearson's correlation coefficient. For the correlation analysis the entire study population as well as the COPD group or even the most severe COPD patient subgroup (FEV<sub>1</sub> cut off arbitrarily set at < 40 % pred.) were used. Analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL). Significance was accepted at  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

**Comparison between COPD and controls.** General and anthropometric characteristics, as well as lung and muscle function data in both patients and control subjects, are indicated in table 2. Group mean values for age and body mass index (BMI) were similar between COPD patients and control subjects. Whereas the COPD group showed a moderate-to-severe obstructive ventilatory defect, healthy controls presented normal pulmonary function. Inspiratory muscle strength and endurance were significantly lower in COPD with respect to the healthy subjects.

The levels of TNF-alpha and IL-6 mRNA synthesised by external intercostal muscles from COPD patients were significantly higher than those observed in healthy controls ( $p < 0.01$ ) (figure 1a). IL-1 mRNA levels showed similar behaviour, although the difference did not reach statistical significance in this case. Finally, no differences were observed for the non-inflammatory IL-10 cytokine gene expression between COPD and controls.

Protein levels of different proinflammatory cytokines showed similar behaviour to their homonymous mRNA. More precisely, COPD patients showed significantly higher TNF-alpha and IL-1 beta protein levels than controls, with IL-6 exhibiting a strong tendency in the same sense (figure 1b). Sarcolemmal damage in turn showed a strong tendency to be higher in COPD patients (figure 2).

**Correlations between Lung and Respiratory Muscle functions.** The impairment in respiratory muscle function directly correlated with the level of airway obstruction ( $FEV_1$  with maximal inspiratory pressure (MIP),  $r = 0.412$ ,  $p < 0.05$ ; and with maximal inspiratory sustainable pressure ( $P_{th_{max}}$ ),  $r = -0.571$ ,  $p = 0.001$ , respectively).



**Intertranscript correlations.** The levels of TNF-alpha mRNA were positively correlated with the concentration of IL-1 beta mRNA ( $r=0.522$ ,  $p<0.01$ ). This relationship was maintained unaltered when only COPD patients were considered ( $r=0.565$ ,  $p<0.01$ ).

**Correlations between mRNA and protein levels.** These relationships oscillated moderately, with  $r$  values ranging from 0.450 ( $p<0.05$ ) in the case of TNF-alpha to 0.571 in the case of IL-6 ( $p=0.001$ ).

**Correlations between transcript levels and lung function.** A moderate but significant inverse correlation existed between the level of airway obstruction, as expressed by FEV<sub>1</sub>, and both the local TNF-alpha and IL-6 gene expressions ( $r= -0.374$  and  $-0.395$ , respectively,  $p<0.05$  both for linear relationships; and  $r=-0.471$ , and  $r=-0.444$ ,  $p\leq 0.01$  both for curvilinear fits) (figures 3a and 3b). The latter relationship remained essentially unaltered when only COPD patients were considered ( $r= -0.366$  for the linear fit). No additional significant correlations were found between cytokine gene expressions and any of the nutritional and lung function parameters analysed in this study.

**Correlations between mRNA levels and respiratory muscle function.** No significant relationships were observed between local cytokine gene expressions and those variables representing respiratory muscle function in either the overall study population or the COPD group. However, if only those patients with FEV<sub>1</sub> lower than 40% pred. were considered (*post hoc* analysis), TNF-alpha transcript showed an inverse relationship with Pth<sub>max</sub> ( $r=-0.641$ ,  $p<0.01$ ).

Finally, sarcolemmal damage did not correlate with cytokine gene expression or with functional variables.

## **DISCUSSION**

The main finding of the present study is the upregulation of TNF-alpha and IL-6 gene expressions observed in the external intercostal muscles of COPD patients, along with a similar tendency evidenced in the other proinflammatory cytokine here analysed, IL-1 beta. Protein levels followed a similar pattern. In addition, a close relationship was found between respiratory muscle function (as expressed by  $P_{th_{max}}$ ) and the local muscle expression of TNF-alpha.

Respiratory muscle dysfunction is commonly observed in COPD patients, and is believed to be the result of the combination of different deleterious factors [2] [4] [7]. Some are specific to these muscles, such as those changes occurring in the geometry of the thorax as a result of pulmonary hyperinflation. This factor predominantly affects the diaphragm which becomes shorter and less efficient. Other deleterious factors are general and therefore can be shared by respiratory and peripheral muscles. This is true of systemic inflammation, drugs, gas exchange impairment and nutritional abnormalities, among others. However, molecular mechanisms occurring within the muscles, whether or not as a result of the systemic signals, are much less understood. Although the diaphragm is the main respiratory muscle at rest, other muscles such as the external intercostals and parasternals also participate actively in ventilation [24-26]. In addition, when there is an increase in respiratory resistances or in ventilatory demands, the intercostal muscles progressively play a more important role [27-29]. Therefore, there is a rationale to hypothesise that molecular events occurring in respiratory muscles should not be confined to the diaphragm and should also be present in the intercostal muscles, which in addition can more easily be sampled in COPD patients.

TNF-alpha, one of the proinflammatory cytokines upregulated in the muscle of our patients, has long been associated with muscle catabolism in different diseases including COPD [30-32]. In addition, it is commonly accepted that loss of muscle mass is one of the main factors contributing to general muscle weakness and exercise intolerance in such patients [4]. Previous studies indicate that muscle function may be compromised by chronic elevation of circulating TNF-alpha via the development of local oxidative stress [32] [33], a phenomenon which we have recently reported within the respiratory muscles of COPD patients [34]. In addition to the action of systemic TNF-alpha on muscle, the present study also suggests a deleterious role for local expression of this cytokine within the fibres. Moreover, a wide variety of functional, structural and metabolic findings has been observed in different muscle groups of COPD [7] [12-14]. Such heterogeneity also reinforces the hypothesis that, in addition to humoral factors, local mechanisms are critical in modulating the phenotype and functional behaviour of each specific muscle.

In the present study, COPD patients also showed an upregulation of the IL-6 gene expression. Moreover, this upregulation was related with the degree of airway obstruction. Recent studies demonstrated that IL-6 expression is induced by physiological muscle contractions. Since inspiratory muscles of COPD patients face increased workloads and therefore increased energy requirements, the tendency to the upregulation of local IL-6 expression could be interpreted as an adaptive response to these higher energy demands. The absence of significant correlations between the IL-6 expression and that of the other two proinflammatory cytokines analysed (TNF-alpha and IL-1 beta), would suggest the presence of different regulatory mechanisms and/or biological roles.

The third proinflammatory cytokine included in the study, IL-1, is considered a catabolic substance which, like TNF-alpha, has been shown to be able to induce muscle contractile

dysfunction through the presence of oxidative stress [35]. Although in the present study the difference in IL-1 beta expression between COPD patients and controls did not reach statistical significance, it is worth noting that a strong positive correlation was detected between the level of this cytokine mRNA and that of TNF-alpha. This suggests the existence of a synergistic action between both cytokines, which would provide a mechanism for increasing the inflammatory response within the respiratory muscles of COPD patients. Furthermore, protein levels of IL-1 beta were found to be significantly increased in muscles of COPD.

Recent reports indicate that, skeletal muscle myocytes are capable of synthesising a variety of cytokines which may act as regulators of skeletal muscle function through an autocrine/paracrine mechanism [36]. Moreover, in a very recent and excellent paper by Vassilakopoulos et al., the authors demonstrated that an increase in ventilatory loads induces the upregulation of different proinflammatory cytokines in the ventilatory muscles of rats [10]. Based on these observations, we hypothesised that local proinflammatory cytokine expression is upregulated in the external intercostals of COPD patients, and that this upregulation may be contributing to the development of respiratory muscle weakness. Although the enhancement of the corresponding gene expressions has been confirmed by the present study, significant correlations with those variables reflecting muscle function were only found in the most severely affected patients. Our results suggest that local expression of inflammatory cytokines could participate in respiratory muscle dysfunction observed in advanced stages of COPD, but probably in the context of a multifactorial scenario (see for instance the coexisting relationships between lung and respiratory muscle functions).

Local expression of TNF-alpha and other proinflammatory cytokines has been reported previously in human locomotor muscles [8] [37] and appears to be related in part to the level of muscle activity. Therefore, the significant relationships observed in our study between the level of airway obstruction and intercostal muscle cytokine expressions probably reflect the effects of this regulatory mechanism. One complementary mechanism that could partly account for the elevated expression of proinflammatory cytokines detected in the present study is the concomitant presence of muscle fibre damage. Previous data showed an increased expression of TNF-alpha and IL-1 to be associated with muscle damage both in inflammatory and non-inflammatory myopathies [38-40], suggesting that these substances play an important role in mediating muscle regeneration and healing. More specifically, inspiratory loading has been reported to be associated with respiratory muscle damage [41-43] and subsequent muscle remodelling [44]. In the present study proinflammatory cytokine upregulation was associated with a marked tendency to show higher levels of sarcolemmal damage in the intercostal muscles of COPD patients. Although a cause-effect relationship cannot be inferred from our data, we speculate about a possible link between both findings.

With or without damage, the increase in the genetic expression of inflammatory cytokines as a result of the increase in respiratory loads, might have a role in muscle remodelling and adaptation occurring in COPD.

#### **Limitations of the study**

Among the muscles that participate in ventilation, the diaphragm is the main inspiratory muscle. However, the possibility of obtaining diaphragm specimens from human beings *in vivo* is very limited due to the need for very invasive surgical procedures (thoracotomy or upper laparotomy). Moreover, in most cases the use of these surgical procedures is directly

linked to the presence of important comorbidity (mostly neoplasms). Needless to say, this also excludes the possibility of obtaining samples from entirely healthy individuals (*true controls*). By contrast, external intercostal muscles, whose main function is to assist inspiration when the diaphragm's function deteriorates or is insufficient to cope with the current workload, are more accessible. In addition, the model used in the present study allows the possibility of a careful selection of both patients and controls, avoiding the problems resulting from comorbidity. This model makes it possible to obtain respiratory muscle samples with minimal invasivity [16].

The second relative limitation of the study is of a methodological nature since our biological techniques are quantitative rather than topographic. In other words, the TaqMan real-time PCR assay permits very precise quantification of the amount of the initial input template. The cellular source of amplicons, however, cannot be identified. Muscle biopsies, in addition to myocytes, may contain adipose tissue, inflammatory cells, epithelial cells, and other components which also may be a source of cytokines. However, previous studies using *in situ* hybridisation and immunohistochemical techniques have demonstrated that fibres are a major source of different proinflammatory cytokines in muscle tissue [8] [9]. The option of quantitative techniques for the present study was directly related to its working hypothesis.

Finally, the wide phenotypic heterogeneity of the population of patients suffering from COPD is an intrinsic limitation of all the studies that focus on pathogenic mechanisms. COPD is a multi-face syndrome characterised by the progressive development of airway obstruction as well as significant but diverse systemic manifestations. Muscle dysfunction, one of the most common systemic expressions of COPD, contributes to exercise intolerance and quality of life impairment. As previously mentioned, the mechanisms that lead to

muscle dysfunction are not completely elucidated and could vary among different COPD phenotypic subtypes, different phases of the disease or even different muscle groups of the same individual. In order to address the phenotypic variety of COPD a relatively large population of patients was included in the present study.

To sum up, our study demonstrates that different proinflammatory cytokines are upregulated in the external intercostal muscles of COPD patients. In addition, their expression appears to be related to the severity of the disease; in other words, to the amount of workload that respiratory muscles have to cope with. Finally, some evidence has been found for the involvement of local TNF-alpha in the pathogenic mechanisms of respiratory muscle dysfunction in severe COPD patients. This mechanism probably co-participates with other systemic and local factors in the development of such a clinical problem.

*Acknowledgements: To Roger Marshall for his editing help and to Angela Roig and Nùria Soler for their invaluable technical support.*

#### **REFERENCES**

1. Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2000; 343:269-280.
2. Wouters EFM. Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 5: Systemic effects of COPD. *Thorax* 2002; 57:1067-1070.
3. Levine S, Nguyen T, Kaiser LR, Rubinstein NA, Maislin G, Gregory C et al. Human diaphragm remodeling associated with chronic obstructive pulmonary disease: clinical implications. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:706-713.
4. American Thoracic Society and European Respiratory Society. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Resp Crit Care Med* 1999; 159 (suppl):S1-S40.
5. Bales CW, Ritchie CS. Sarcopenia, weight loss, and nutritional frailty in the elderly. *Annu Rev Nutr* 2002; 22:309-323.
6. Visser M, Pahor M, Taaffe DR, Goodpaster BH, Simonsick EM, Newman AB et al. Relationship of interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  with muscle mass and muscle strength in elderly men and women: the health ABC study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2002; 57:M326-M332.
7. Gosselink R, Troosters T, Decramer M. Distribution of muscle weakness in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *J Cardiopulm Rehabil* 2000; 20:353-360.
8. Greiwe JS, Cheng B, Rubin DC, Yarasheski KE, Semenkovich CF. Resistance exercise decreases skeletal muscle tumor necrosis factor alpha in frail elderly humans. *FASEB J* 2001; 15:475-482.



9. 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; 12:1329-1335.
10. Vassilakopoulos T, Divangahi M, Rallis G, Kishta O, Petrof B, Comtois A, Hussain SNA. Differential cytokine gene expression in the diaphragm in response to strenuous resistive breathing. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:154-161.
11. Reid MB and Li Y.-P. Cytokines and oxidative signalling in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 2001; 171:225-232.
12. Levine S, Kaiser L, Leferovich J, Tikunov B. Cellular adaptations in the diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 1997; 337:1799-1806.
13. Whittom F, Jobin J, Simard PM, LeBlanc P, Simard C, Bernard S, Belleau R, Maltais F. Histochemical and morphological characteristics of the vastus lateralis muscle in COPD patients. *Med Sci Sports Exerc* 1998; 30:1467-1474.
14. Gea J, Pasto M, Carmona MA, Orozco-Levi M, Palomeque J, Broquetas J. Metabolic characteristics of the deltoid muscle in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2001; 17:939-945.
15. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. NHLBI/WHO workshop report. Bethesda, National Heart, Lung and Blood Institute. Update of the Management Sections, GOLD website ([www.goldcopd.com](http://www.goldcopd.com)).
16. 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; 166:1491-1497.

17. Roca J, Sanchis J, Agusti-Vidal A et al. Spirometric reference values from a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1986; 22:217-224.
18. Roca J, Burgos F, Barbera JA et al. Prediction equations for plethysmographic lung volumes. *Respir Med* 1998; 92:454-460.
19. Roca J, Rodriguez-Roisin R, Cobo and, Burgos F, Perez J, Clausen JL, Single-breath coal monoxide diffusing capacity prediction equations from a Mediterranean population. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141:1026-1032.
20. Morales P, Sanchis J, Lamb PJ, Diez JL. Maximum static respiratory pressures in adults. The reference values for a Mediterranean Caucasian population. *Arch Bronconeumol* 1997; 33:213-219.
21. Martyn JB, Moreno RH, Pare PD, Pardy RL. Measurement of inspiratory muscle performance with incremental threshold loading. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:919-923.
22. 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; 25:402-408.
23. Palacio J, Galdiz JB, Alvarez FJ, Orozco-Levi M, Lloreta J, Gea J. Procion orange tracer dye technique vs. identification of intrafibrillar fibronectin in the assessment of sarcolemmal damage. *Eur J Clin Invest* 2002; 32:443-447.
24. De Troyer A, Farkas GA. Contribution of the rib cage inspiratory muscles to breathing in baboons. *Respir Physiol* 1994; 97:135-145.
25. DiMarco A, Romaniuk JR, Supinski GS. Paraesternal and external intercostal shortening during eupneic breathing. *J Appl Physiol* 1990; 60:2222-2226.

26. De Troyer A, Kelly S, Macklem PT. Mechanics of intercostal space and action of external and internal intercostal muscles. *J Clin Invest* 1985; 75:850-895.
27. De Troyer A. The electro-mechanical response of canine inspiratory intercostal muscles to increased resistance: the cranial rib-cage. *J Appl Physiol* 1992; 451:445-461.
28. De Troyer A. The electro-mechanical response of canine inspiratory intercostal muscles to increased resistance: the caudal rib-cage. *J Appl Physiol* 1992; 451:463-476.
29. DiMarco A, Romaniuk JR, Supinski GS. Paraesternal and external intercostal responses to various respiratory maneuvers. *J Appl Physiol* 1992; 73:979-986.
30. Catalano MG, Fortunati N, Arena K, Costelli P, Aragno M, Danni O, Boccuzzi G. Selective up-regulation of tumor necrosis factor receptor I in tumor-bearing rats with cancer-related cachexia. *Int J Oncol* 2003; 23:429-436.
31. Dorge SE, Roux-Lombard P, Dayer JM, Koch KM, Frei U, Lonnemann G. Plasma levels of tumor necrosis factor (TNF) and soluble TNF receptors in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1994; 58:1000-1008.
32. 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; 150:1453-1455.
33. Li X, Moody MR, Engel D, Walker S, Clubb FJ, Sivasubramanian N et al. Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- $\alpha$  causes oxidative stress and contractile dysfunction in mouse diaphragm. *Circulation* 2000; 102:1690-1696.
34. Harrington D, Anker SD, Chua TP, Webb-Peploe KM, Ponikowski PP, Poole-Wilson PA, Coats AJ. Skeletal muscle function and its relation to exercise tolerance in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30:1758-1764.

35. Barreiro E, de la Puente B, Minguella J, Corominas JM, Serrano S, Hussain SN, Gea J. Oxidative Stress and Respiratory Muscle Dysfunction in Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005 Feb 25; [Epub ahead of print].
36. Cheng XS, Shimokawa H, Momii H, Oyama J, Fukuyama N, Egashira K et al. Role of superoxide anion in the pathogenesis of cytokine-induced myocardial dysfunction in dogs in vivo. *Cardiovasc Res* 1999; 42:651-659.
37. Steensberg A, Keller C, Starkie RL, Osada T, Febbraio MA, Pedersen BK. IL-6 and TNF-alpha expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002; 283:E1272-E1278.
38. Rabinovich R, Figueras M, Ardite E, Carbo N, Troosters T, Filella X et al. Increased tumour necrosis factor-alpha plasma levels during moderate-intensity exercise in COPD patients. *Eur Respir J* 2003; 21:789-794.
39. Tews DS, Goebel HH. Cytokine expression profile in idiopathic inflammatory myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55:342-347.
40. De Bleecker JL, Meire VI, Declercq W, Van Aken EH. Immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha and its receptors in inflammatory myopathies. *Neuromuscul Disord* 1999; 9:239-246.
41. Kuru S, Inukai A, Kato T, Lieng Y, Kimura S, Sobue G. Expression of tumor necrosis factor-alpha in regenerating muscle fibers in inflammatory and non-inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol* 2003; 105:217-224.
42. 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; 155:1110-1116.
43. Macgowan NA, Evans KG, Road JD, Reid WD. Diaphragm injury in individuals with airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1654-1659.

44. 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; 164:1734-1739.
45. Gea J, Hamid Q, Czaika G, Zhu E, Mohan-Ram V, Goldspink G, Grassino A. Expression of myosin heavy-chain isoforms in the respiratory muscles following inspiratory resistive breathing. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1274-1278.

**Figure Legends.**

Figure 1.

(a) Relative cytokine mRNA levels in external intercostal muscles of COPD patients and control subjects. (b) Protein levels of the corresponding cytokines in muscles from both groups. Values are represented by means  $\pm$  SD. White bars represent controls whereas black bars correspond to COPD patients. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ).

Figure 2. Sarcolemmal damage (as assessed by the percentage of albumin positive fibres) in the intercostal muscles of COPD and controls.

Figure 3. Relationships between cytokine expression and airway obstruction: (a) TNF- $\alpha$  mRNA vs. FEV<sub>1</sub>; (b) IL-6 mRNA vs. FEV<sub>1</sub>. Controls are represented as squares.

**Table 1. Probes used for quantitative real-time PCR of the studied genes.**

Genes	Assay ID	Nucleotide sequence (5'-3')	Genebank Accession #
TNF-alpha	Hs00174128_m1	ATGTTGTAGCAAACCCCTCAAGCTGA	NM_000594
IL-1 beta	Hs00174097_m1	TATGGAGCAACAAGTGGTGTCTCC	NM_000576
IL-6	Hs00174131_m1	ATTCAATGAGGAGACTTGCCCTGGTG	NM_000600
IL-10	Hs00174086_m1	CTACGGCGCTGTCATCGATTTCTTC	NM_000572
ACTB (Housekeeping)	Hs99999903_m1	TCGCCTTTGCCGATCCGCCGCCCGT	NM_001101

All TaqMan® MGB (minor groove binder) probes are dual-labelled with a reporter dye (6-FAM) at the 5' end and a nonfluorescent quencher (NFQ) at the 3' end. TNF-alpha, Tumor Necrosis Factor alpha; ACTB, Actin beta.

**Table 2. Subject characteristics**

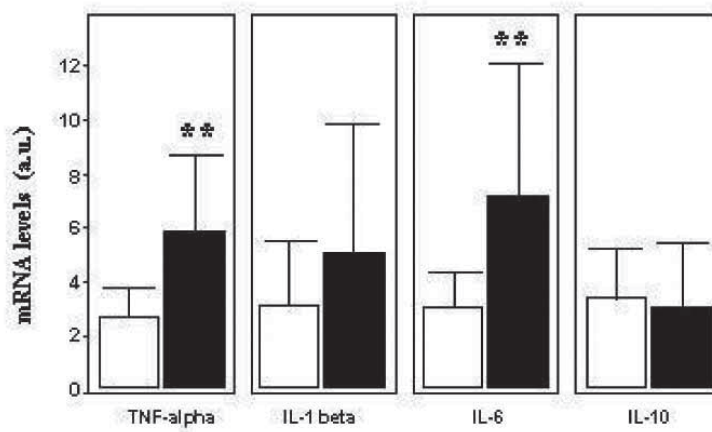
	Control (n = 6)	COPD (n = 25)
Age, yr	69 (7)	66 (5)
BMI, kg/m <sup>2</sup>	26.2 (2.8)	27.6 (3.9)
<u>Lung function</u>		
FEV <sub>1</sub> , % pred	99 (16)	34 (12) ***
FEV <sub>1</sub> /FVC, %	72 (4)	46 (11) ***
RV, % pred	107 (16)	176 (39) ***
TLC, % pred	102 (5)	105 (17)
RV/TLC, %	39 (3)	63 (8) ***
PaO <sub>2</sub> , mm Hg	98 (3)	65 (3) ***
<u>Muscle function</u>		
MIP, % pred	84 (23)	65 (22) *
Pth <sub>max</sub> , cm H <sub>2</sub> O	-64 (20)	-40 (19) *
Tth <sub>80</sub> , min	15.2 (6.5)	10.7 (5.8)

Values are represented by means ( $\pm$  SD).

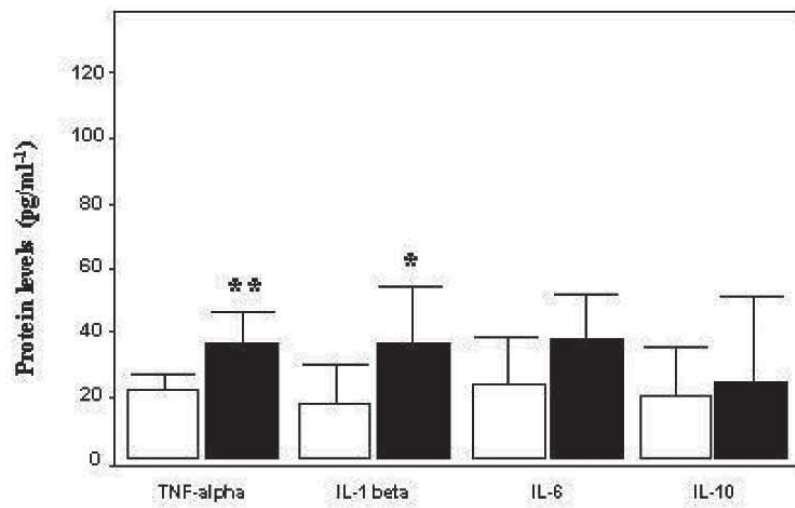
Abbreviations: BMI, body mass index; FEV<sub>1</sub>, forced expiratory volume in one second; FVC, forced vital capacity; RV, residual volume; MPI, maximum inspiratory pressure; Pth<sub>max</sub>, maximum inspiratory sustainable pressure (obtained during progressive inspiratory threshold loading); Tth<sub>80</sub>, endurance time under constant submaximal inspiratory loads (80% Pth<sub>max</sub>). (\*) and (\*\*\*) express  $p < 0.05$  and  $p \leq 0.001$ , respectively, between control subjects and COPD patients.



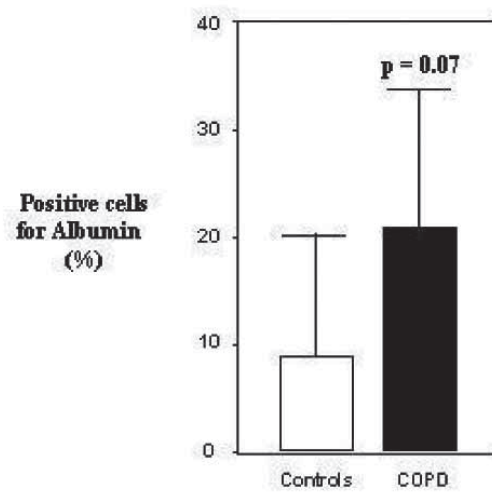
C. Casadevall et al. figure 1a



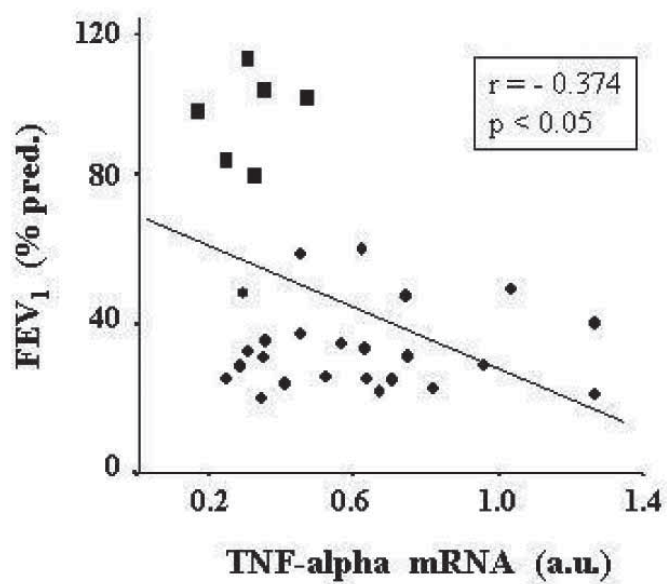
C. Casadevall et al. figure 1b



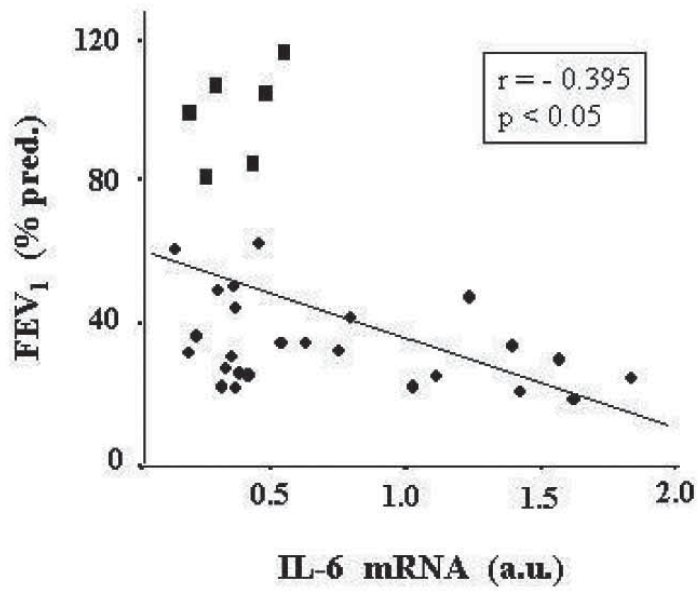
C. Casadevall et al. figure 2



C. Casadevall et al, figure 3a



C. Casadevall et al, figure 3b





## Capítulo 7

# RESUMEN DE RESULTADOS

### ESTUDIO 1

#### Síndrome de bajo peso asociado a la EPOC en nuestro medio

*Arch Bronconeumol. 2002;38:580-4.*

Esta investigación demuestra que sólo un 3% de los pacientes con EPOC de nuestra área de influencia presentan bajo peso corporal (definido como IMC inferior a 18 kg/m<sup>2</sup>). Esta prevalencia aumenta a 6,6% si el dintel se define como 20 kg/m<sup>2</sup>. Resulta de interés que en este estudio al comparar los sujetos con el dintel por debajo de 18 kg/m<sup>2</sup> con los de peso conservado, únicamente presentan diferencias en el cociente espirométrico porcentual, con una tendencia a una menor capacidad de difusión del monóxido de carbono (DL<sub>CO</sub>). Por otra parte, al comparar los sujetos con el dintel por debajo de 20 kg/m<sup>2</sup>, las diferencias eran significativas únicamente en relación con la transferencia de gases. Además, se observan correlaciones significativas entre las variables antropométrica y tanto el FEV<sub>1</sub>/FVC como la DL<sub>CO</sub> y la del coeficiente de transferencia del monóxido de carbono (K<sub>CO</sub>).

### ESTUDIO 2

#### Relevance of assessing quadriceps endurance in patients with COPD

*Eur Respir J. 2004;24:129-136.*

En esta investigación se confirma que los pacientes con EPOC muestran una disminución significativa en la fuerza del músculo cuádriceps (Q<sub>MVC</sub>) (~43% del valor de los controles sanos). Sin embargo, resalta que la resistencia del músculo cuádriceps está afectada de forma precoz, inclusive en pacientes con fuerza relativamente preservada. De hecho, todos los enfermos con EPOC muestran una claudicación prematura, y presentan un tiempo de tolerancia al ejercicio (i. e. resistencia) aproximadamente de un 77% más bajo que los controles sanos, a pesar de ejercitarse ante una carga externa normalizada respecto de la fuerza intraindividuo. Adicionalmente, el estudio muestra la ausencia de correlación entre la disminución de la resistencia y la actividad física diaria habitual. Todos los pacientes claudicaron en la prueba de resistencia debido a síntomas limitantes en las piernas (molestias o dolor, disminución de la frecuencia mediana en el EMG (*fEMG*) y disminución transitoria de la fuerza del cuádriceps, equivalente a un 25% de la inicial. No se observaron limitantes ventilatorias ni cardíacas durante la prueba. Se encontró una débil asociación entre el grado de obstrucción aérea (FEV<sub>1</sub>, % pred) y la resistencia de cuádriceps (Q<sub>Tlim</sub>). No hubo correlación entre fuerza y resistencia del cuádriceps y no se encontró ninguna correlación entre Q<sub>Tlim</sub> y perímetro del muslo o variables de tipo nutricional.

### **ESTUDIO 3**

#### **Injury of peripheral muscles in susceptible smokers with Chronic Obstructive Pulmonary Disease**

*Enviado a revisión a CHEST, 2006.*

Esta investigación demuestra que tanto los pacientes con EPOC como los controles sanos muestran signos de daño sarcolémico y disrupción sarcomérica en sus músculos periféricos (cuádriceps), independientemente de que sea fumador activo o no. Sin embargo, tanto la exposición activa al humo del cigarrillo como la presencia de la EPOC se asocian significativamente con un incremento en el daño sarcolémico y sarcomérico en el cuádriceps. Este daño muscular se encontró incrementado no sólo en los casos de obstrucción grave al flujo aéreo, sino también en los estadios moderado y leve de la enfermedad. Se encontró una relación dosis-respuesta entre la función del músculo cuádriceps (i.e.  $Q_{Tim}$ ) y el daño celular muscular (tanto sarcolémico como sarcomérico).

### **ESTUDIO 4**

#### **Upregulation of proinflammatory cytokine genes in external intercostal muscles of COPD patients**

*Enviado a revisión al Eur Respir J, 2005.*

Esta investigación demuestra que los niveles de ARNm del TNF- $\alpha$  y de la IL-6 sintetizados por los músculos intercostales externos de los pacientes con EPOC están incrementados al comparar con controles sanos por edad y género. Los niveles de ARNm de IL-1 $\beta$  mostraron una tendencia similar aunque no alcanzan diferencias estadísticamente significativas al compararlos con los controles sanos. No se observaron diferencias para la expresión génica de la citocina anti-inflamatoria IL-10 entre los dos grupos de estudio. La expresión de proteínas de las diferentes citocinas inflamatorias evaluadas muestra un comportamiento similar a la transcripción génica, lo que sugiere la ausencia de un control post-transcripcional. Específicamente, los pacientes con EPOC mostraron niveles de proteínas significativamente mayores de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  que los controles sanos, mientras que la IL-6 mostró una tendencia en el mismo sentido. El daño sarcolémico mostró una fuerte tendencia a ser mayor en los pacientes con EPOC.



## Capítulo 8

# DISCUSIÓN GENERAL

### **ASPECTOS METODOLÓGICOS GENERALES DE LAS INVESTIGACIONES INCLUIDAS EN ESTA MEMORIA**

Desde el punto de vista del tesinando, antes de entrar en la materia específica de cada uno de los estudios, merecen especial atención cuatro conceptos que caracterizan la presente memoria de Tesis Doctoral. El primero de estos conceptos tiene que ver con la coherencia de las investigaciones realizadas e incluidas en la memoria. El segundo está relacionado con la relevancia de responder a los interrogantes propuestos en cada estudio. El tercero vincula con la metodología utilizada para responder a dichas preguntas; es decir, con la selección de la población estudiada (tanto pacientes como voluntarios sanos) e instrumentos de análisis utilizados. El cuarto y último punto hace referencia a la potencial aplicación clínica al tener en cuenta el carácter de transferencia a ésta de la investigación más básica (“*translational research*”).

#### **Comentarios respecto de la coherencia de los estudios**

La primera característica a resaltar de los estudios incluidos en esta memoria tiene que ver con el hecho de que los trabajos realizados son de índole original y no se trata de una agrupación interesada de trabajos aislados. Por el contrario, esta Tesis Doctoral forma parte de una línea amplia y muy consolidada de investigación en músculo, propia de la *Unitat de recerca en Múscul i Aparell Respiratori (URMAR)* en los últimos 15 años. Todos los estudios abordan el problema de la disfunción

muscular en los pacientes con EPOC; el primer estudio, y su respectiva carta al editor, contrastan la inquietud acerca de la prevalencia de bajo peso en los pacientes con EPOC de los países anglosajones y de la europa central y del norte con respecto a nuestra población; como la prevalencia de bajo peso es escasa en nuestro medio, y no justifica el problema de disfunción muscular, comenzamos un segundo estudio prospectivo donde evaluamos específicamente la resistencia del músculo cuádriceps en dichos pacientes; paralelamente iniciamos un tercer estudio donde valoramos el daño a nivel sarcolémico y sarcomérico en el cuádriceps de los pacientes con EPOC. Por último, al tratar de evaluar un músculo que no estuviera afecto por el decondicionamiento en los pacientes con EPOC, realizamos un cuarto estudio donde medimos en el músculo intercostal externo la expresión de citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias, y su posible correlación con las variables antropométricas y respiratorias, así como el daño celular muscular. Los trabajos incluidos en esta Tesis Doctoral guardan una coherencia tanto desde el punto de vista conceptual como temporal. Todos ellos han sido publicados o están en revisión en revistas indexadas. También se incluyen al final de esta memoria algunos trabajos originales publicados en forma de pósters (resúmenes). Estos últimos delimitan proyectos futuros al generar un conjunto de nuevos interrogantes.

#### **Comentarios respecto de la relevancia de los interrogantes formulados**

La segunda característica tiene que ver con la relevancia potencial de las preguntas que se

han intentado responder con los trabajos de investigación aquí presentados. De hecho, todos ellos han sido dirigidos a caracterizar y profundizar en la medida de lo posible en la valoración y etiopatogenia de la disfunción muscular de los pacientes con EPOC. En los últimos años hemos asistido a un cambio en el paradigma (o preconcepción) de esta entidad y se ha establecido que, a pesar de ser el pulmón el órgano diana inicial, existe también afectación de otros órganos y sistemas en estos pacientes. Uno de estos sistemas es el músculo-esquelético, tanto *periférico* (músculos de las extremidades) como respiratorio (diafragma, accesorios de la inspiración y músculos espiratorios). Como se ha visto, los pacientes con EPOC presentan grados diversos de disfunción muscular en distintos compartimentos musculares. Esta disfunción no se puede predecir por variables convencionales antropométricas ni de función pulmonar convencional. Más aún, esta disfunción muscular no constituye un aspecto meramente descriptivo o académico en la caracterización de los pacientes con EPOC. Por el contrario, la disfunción muscular tiene relevancia tanto a nivel clínico individual y de deterioro de la calidad de vida, al relacionarse con la intensidad de los síntomas (disnea, molestias en las piernas), como a nivel de salud pública al relacionarse con una mayor demanda de servicios sanitarios y menor expectativa de vida.

### **Comentarios respecto a la identificación y reclutamiento de pacientes**

La tercera característica de la Tesis Doctoral trata del aspecto metodológico riguroso que ha justificado, en cierta forma, el tiempo prolongado (5 años) en el cual se han desarrollado estos trabajos. Este aspecto hace referencia a la selección cuidadosa de individuos sanos “verdaderos”, así como de pacientes con EPOC sin comorbilidad relevante asociada. Dado que los principales interrogantes que se han incluido en esta Tesis Doctoral tienen que ver con el estudio de aspectos fisiopatológicos de las relaciones entre disfunción muscular y enfermedad, la presencia de comorbilidades y sus

tratamientos podrían actuar como factores de confusión. Esta ha sido demostrado por trabajos previos de nuestro medio (García-Aymerich, J. *et al.*; 2000), donde más del 90% de los pacientes con EPOC son portadores de comorbilidad relevante (p.e. cardiopatía isquémica, diabetes grave u otras metabopatías, tratamientos con sustancias que afectan la función muscular, etc...). Esto obliga a seleccionar cuidadosa y rigurosamente a los pacientes (en una proporción que ha sido de 1:10 dentro de los individuos que han requerido ingreso por exacerbación en nuestro centro). En cuanto a los individuos control destaca la necesidad de identificar y seleccionar individuos de similar edad y del mismo género para poder enunciar hipótesis fisiopatológicas y tener, además, valores de referencia propios del medio en el que hemos realizado los estudios. Aunque pueda parecer una tarea relativamente sencilla, la experiencia derivada de estos estudios demuestra que el reclutamiento de voluntarios sanos “verdaderos” es realmente ardua, si se tiene en cuenta tanto la elevada prevalencia de tabaquismo en nuestro país como la aparición de diferentes enfermedades de la quinta a la séptima década de la vida. Así mismo, debemos descartar la elevada frecuencia de alteraciones imprevistas en los exámenes de laboratorio realizados, y que se relacionan probablemente con la obesidad o el consumo de alcohol. En este contexto, hay que enfatizar que la búsqueda que el tesinando y restantes miembros del equipo investigador han tenido que realizar ha sido activa, y que incluye desde población transeúnte hasta familiares de pacientes o enfermos que acudieron al hospital por patologías quirúrgicas (p.e. cirugía ocular o de vías biliares). Estos conceptos resaltan, pues, las dificultades de reclutamiento de la población de estudio en las diferentes investigaciones y, al mismo tiempo, la relevancia a la hora de intentar generalizar en las conclusiones.

### **Comentarios respecto a la potencial aplicabilidad clínica**

La cuarta característica de esta Tesis Doctoral tiene que ver con las potenciales implica-

ciones clínicas que se desprenden de los trabajos realizados. Esta es una constante de nuestro grupo de investigación, que al estar formado fundamentalmente por médicos dedicados a la asistencia, concede una singular importancia a la aplicabilidad (trasferencia) de los conocimientos adquiridos con la investigación. Específicamente, el estudio 1 incluye artículo original (Coronell, C. *et al.*; 2002b) y una carta al editor (Coronell, C. *et al.*; 2002a), en los que destaca la baja prevalencia del *síndrome de bajo peso* asociado a la EPOC en nuestro medio. Los resultados de esta investigación epidemiológica retrospectiva permitieron enfatizar que la disfunción muscular no debería interpretarse como un sinónimo o una consecuencia de la caquexia muscular y la malnutrición (relativamente rara) únicamente, como se ha generalizado a partir de estudios desarrollados en otros medios europeos (norte y centro-Europa, especialmente) o inclusive en América del Norte (Canadá y Estados Unidos de América). Estos hallazgos tienen relevancia clínica porque permiten postular hipótesis alternativas. Precisamente el estudio 2 está representado por un artículo original publicado en el *European Respiratory Journal* (Coronell, C. *et al.*; 2004) que resalta la importancia que tienen otros factores etiopatogénicos en la aparición y desarrollo de la disfunción muscular esquelética en pacientes con EPOC. En esta investigación se demuestra que la disfunción muscular existe incluso en pacientes con estado nutricional preservado, y clasificados en grupos con deterioro grave de la función pulmonar. Por otra parte, demuestra la ausencia de capacidad predictiva que tiene la medición aislada de la fuerza muscular para detectar alteraciones graves en la resistencia y, por tanto, debe explorarse sistemáticamente esta segunda propiedad funcional muscular en los pacientes con EPOC. El trabajo anterior dio origen a una investigación (estudio 3) actualmente en revisión por pares en *Chest* (Coronell, C. *et al.*; 2006), en los que se han intentado definir algunas de las bases celulares (membrana muscular) y subcelulares (sarcómeras) de la disfunción muscular. Subramos aquí que estas investigaciones incluyen la toma de biopsias

musculares con la utilización de un modelo ambulatorio validado en nuestro laboratorio, y que todas las biopsias fueron realizadas y procesadas con diferentes técnicas por el propio tesinando. Desde el punto de vista científico, esta investigación demuestra la existencia de un deterioro estructural en los músculos periféricos de los pacientes con EPOC, que nuevamente es independiente del estado nutricional, actividad física habitual y deterioro de la función respiratoria. Además, hemos podido definir que las señales definidas como **daño muscular** tienen relevancia al correlacionar de forma inversa con fuerza y resistencia del músculo evaluado; es decir, el daño muscular parece formar parte del sustrato fisiopatológico de la disfunción muscular en la EPOC. Sin embargo, el estudio no permite definir las causas del daño muscular. Precisamente estos interrogantes dieron origen a un estudio más reciente (estudio 4), (Casadevall, C. *et al.*; 2006), actualmente en revisión en el *European Respiratory Journal*, dirigido a evaluar la potencial relación que puede existir entre la disfunción muscular, el daño celular y los mediadores de la inflamación (en este caso, factor de necrosis tumoral, interleucina 6, interleucina 1- $\beta$ ) medido en extractos homogenizados de músculos intercostales externos. En este caso el estudio se centró en los músculos respiratorios, lo que permitió obviar el efecto del sedentarismo. Este último estudio denota que los músculos respiratorios propiamente dichos expresan niveles de mediadores inflamatorios aumentados en pacientes con EPOC.

### **ASPECTOS CONCEPTUALES GENERALES DE LAS INVESTIGACIONES INCLUIDAS EN ESTA MEMORIA**

#### **¿Por qué tiene interés estudiar los músculos de pacientes con EPOC?**

El sistema respiratorio es complejo. Sin embargo podría resumirse en tres componentes principales: (1) el bloque interactivo pulmón-corazón, como sistema responsable del inter-

cambio pulmonar de gases; (2) los elementos neurológicos, perceptuales y neuropsicológicos (córtex cerebral, bulbo y plexos periféricos), como sistema de control de la ventilación; y (3) los músculos respiratorios (inspiratorios y espiratorios), que constituyen el sistema contráctil y establecen el flujo de aire necesario para el intercambio aéreo con el ambiente. Entre estos últimos, el diafragma es el principal músculo respiratorio. Por esta razón es posible que el interés por el estudio de los músculos haya tenido que ver con la percepción de protagonismo del diafragma en la historia natural de la EPOC y otras enfermedades. Esta interpretación fisiopatológica se ha enriquecido con el desarrollo reciente de algunos estudios que han definido que todos los músculos, tanto los respiratorios como los periféricos, sufren cambios en los pacientes con EPOC. Sin embargo, ha resultado evidente que estos cambios no tienen ni el mismo sentido ni la misma magnitud en todos los compartimentos musculares (p.e. diafragma frente a músculos de la caja torácica o de las extremidades inferiores). Este concepto fue una aportación específica de nuestro grupo bajo el título de la “Teoría de los compartimentos musculares en la EPOC” y ha sido objeto de dos publicaciones en revistas indexadas (Gea, J. *et al.*; 2001; Orozco-Levi, M. *et al.*; 2000).

*Por todo ello, los trabajos incluidos en la presente memoria se discuten en el contexto del conocimiento y estado actual del tema, parten de la óptica de los músculos periféricos para culminar en los aspectos más recientes ligados con los músculos respiratorios.*

## ¿QUÉ APORTACIONES NOVEDOSAS HACE LA PRESENTE MEMORIA DE TESIS DOCTORAL?

### Aportaciones concretas respecto a la fatiga y debilidad muscular en pacientes con EPOC.

La función de los músculos de pacientes con EPOC puede verse afectada por diversas

patologías, tanto en su capacidad para generar tensión (fuerza) como en su resistencia, o en ambas. La fatiga muscular es una condición fisiológica en la que disminuyen la fuerza o la velocidad de contracción ante una carga determinada y característicamente, es reversible con el reposo (National Health Service Executive.; 1996). A diferencia de la anterior, la debilidad muscular es una condición patológica caracterizada por un deterioro funcional del músculo que no es reversible con el reposo y que además, predispone a la fatiga.

La fatiga muscular se instaura cuando las demandas exceden la capacidad mecánica del músculo, cuando el consumo energético excede el aporte o cuando la extracción de los catabolitos no es proporcional a su síntesis. De ello se deduce que los factores que intervienen en la fatiga del diafragma son: la fuerza que se genera en cada contracción, el trabajo respiratorio, el aporte de oxígeno y nutrientes, la tasa de extracción de los productos metabólicos, las reservas energéticas del músculo y la eficiencia de la propia contracción.

Como ya se ha dicho anteriormente, la fatiga de los músculos respiratorios no se presenta en individuos sanos en condiciones normales, sino solo en circunstancias excepcionales. Sin embargo, está bien documentado que la fatiga diafragmática puede aparecer tanto en enfermos con EPOC o patologías neuromusculares que precipitan la insuficiencia ventilatoria (Macklem, P.T. *et al.*; 1977), como en el proceso de *destete* de la ventilación mecánica (Cohen, C.A. *et al.*; 1982).

Dentro de este marco conceptual, la presente memoria aporta tres conceptos novedosos. En primer lugar, el trabajo de investigación 1, titulado *Síndrome de bajo peso asociado a la EPOC en nuestro medio* (Coronell, C. *et al.*; 2002b) y su respectiva carta al editor titulada *COPD and body weight in a Mediterranean population* (Coronell, C. *et al.*; 2002a) demuestran que **la malnutrición (evaluada como bajo peso) no justifica la alteración funcional o es-**

tructural de los pacientes con EPOC de nuestro medio. Específicamente nuestros resultados expresan que la prevalencia de *síndrome de bajo peso* asociada a la EPOC es inferior al 5%. Sin embargo, estos pacientes muestran diversos grados de disfunción de sus músculos respiratorios, por lo que se debe considerar que otros factores diferentes a la malnutrición son muy relevantes, al menos en nuestro medio, en la fisiopatología de la disfunción muscular en la EPOC. En segundo lugar, el trabajo de investigación 2 incluido en esta memoria aporta información adicional respecto a que existen factores sistémicos -no sólo los mecánicos- involucrados en la generación y perpetuación de la disfunción muscular en pacientes con EPOC. Esta investigación, titulada *Relevance of assessing quadriceps endurance in patients with COPD* (Coronell, C. *et al.*; 2004), demostró que los pacientes con EPOC muestran un deterioro de la fuerza del cuádriceps en magnitudes de 43% al comparar con el grupo de referencia. El deterioro de la resistencia fue aún mayor, al alcanzar un deterioro del 77% con respecto a los valores de los sanos. Resulta de interés que todos los pacientes con EPOC claudicaron en un período corto de tiempo ante la realización del ejercicio, lo cual no se observó en ninguno de los individuos sanos. Esta claudicación se acompañó de un descenso significativo de la frecuencia mediana del espectro electromiográfico y una disminución transitoria en la contracción voluntaria máxima. Este deterioro de la función muscular periférica fue evidente no sólo en los pacientes con mayor gravedad de la EPOC, sino también en aquellos con obstrucción leve o muy leve del flujo aéreo y actividad física preservada y, además, fue independiente de las variables de función pulmonar, antropométricas o de la misma fuerza del músculo evaluado. Desde el punto de vista conceptual, esta segunda investigación demuestra que la resistencia del músculo cuádriceps está gravemente disminuida en pacientes con EPOC, incluso en aquellos que tienen una actividad física habitual normal y un deterioro leve de la función pulmonar. Esta susceptibilidad a la claudicación (fatigabilidad) precoz no puede

ser predicha a partir de la gravedad de la enfermedad ni del estado nutricional, ni tampoco de la disminución de la fuerza del grupo muscular evaluado.

En tercer lugar, el trabajo de investigación 3 de esta memoria aporta información novedosa adicional, bajo el título *Injury of peripheral muscles in susceptible smokers with Chronic Obstructive Pulmonary Disease* (Coronell, C. *et al.*; 2006). Específicamente este estudio ha estado dirigido a responder tres preguntas: si la presencia de la EPOC se asocia a lesión periférica del músculo; si la lesión del músculo se asocia a debilidad funcional relevante; y si la lesión del músculo puede ser justificada solamente por el decondicionamiento. Se encontraron signos de daño tanto en los individuos controles como en los pacientes con EPOC, no sólo en los casos que presentaban obstrucción grave al flujo aéreo sino también en los estadios moderado y leve de la enfermedad. El fumar activamente y la presencia de EPOC fueron asociados perceptiblemente a mayor lesión del músculo. La conclusión ha sido que la lesión periférica del músculo es evidente tanto en estadios leve, como moderado y grave de la EPOC, incluso en ausencia de insuficiencia respiratoria, hipercapnia, tratamiento crónico con esteroides, bajo peso, o comorbilidad relevante. Los enfermos con EPOC y la situación de “enfermo fumador activo” se asociaron con mayor daño sarcolémico y sarcomérico al compararlos con los controles. Además, se encontró una asociación entre función muscular (evaluada como tiempo de resistencia al ejercicio) y *daño muscular*. Este trabajo también aporta otros conceptos novedosos; brevemente, **este estudio demuestra que (1) las fibras del cuádriceps no están atroficas en pacientes con EPOC de la región mediterránea; en el mismo sentido (2) la densidad capilar se mantiene estable.** La enfatización de que los pacientes son de la zona mediterránea liga directamente con los trabajos anteriormente descritos por el tesinando respecto al estado nutricional. Estamos obligados a especular diciendo que el bagaje genético puede estar involucrado en estas

**diferencias.** Por el contrario, esta hipótesis es parcialmente refutada porque precisamente los trabajos del grupo de Serres (Francia) y Maltais (Montreal) han sido realizados en poblaciones que supuestamente comparten un bagaje genético similar. En consecuencia, estamos tentados a suponer que existen factores ambientales y culturales (p.e. dieta, movilidad) en la base de esta “protección” relativa a la atrofia muscular global y al síndrome de bajo peso asociado a la EPOC. Estos resultados apoyan que factores sistémicos con efectos deletéreos están actuando sobre los músculos periféricos de fumadores con EPOC, y aumentan la susceptibilidad de las fibras musculares al *daño* sobre la membrana y la sarcómera.

**Aportaciones respecto del papel de mediadores inflamatorios en la disfunción muscular en la EPOC.** Teniendo en cuenta lo comentado en el ítem anterior, el interrogante que justificó el último trabajo de investigación de esta memoria fue la posibilidad que un estado inflamatorio local persistente justificará la alteración estructural y/o funcional de los músculos esqueléticos en los pacientes con EPOC. El cuarto trabajo original titulado *Upregulation of proinflammatory cytokine genes in the external intercostal muscles of COPD patients* (Casadevall, C. *et al.*; 2006) tuvo como objetivo caracterizar la expresión local de diferentes citocinas, todas ellas potencialmente involucradas en la disfunción muscular. El estudio se realizó en un músculo respiratorio típico en pacientes con EPOC y controles. Se evaluó la expresión local de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 mediante retrotranscripción-reacción

de la polimerasa en cadena a tiempo real (real time-RT-PCR, sigla en inglés) e inmunoensayo enzimático (ELISA), así como el daño sarcolémico mediante inmunohistoquímica. El estudio demostró que hay mayor expresión de TNF- $\alpha$  e IL-6 (a nivel de ARNm) en los músculos de los pacientes con EPOC al compararlos con los controles sanos, mientras que existía una tendencia de la IL-1 $\beta$  en la misma dirección. Se detectaron resultados similares a nivel de detección de proteínas mediante el ELISA. Además, se demostró en los pacientes con EPOC una tendencia a tener mayor daño sarcolémico en el músculo intercostal externo que en los individuos controles. Finalmente se detectaron correlaciones moderadas del nivel de expresión de las citocinas inflamatorias con el grado de obstrucción bronquial. En los pacientes mas graves, la disfunción muscular respiratoria era proporcional al grado de expresión de TNF- $\alpha$ , que sugiere una relación causa-efecto entre ambos fenómenos. En resumen nuestro estudio demuestra que las diferentes citocinas proinflamatorias se incrementan en el músculo intercostal de pacientes con EPOC. Además su expresión parece relacionarse con la gravedad de la enfermedad, en otras palabras a la cantidad de sobrecarga que los músculo respiratorios deben soportar. Finalmente, se ha encontrado alguna evidencia de la participación local del TNF- $\alpha$  en los mecanismos patogénicos de la disfunción de los músculos respiratorios en los pacientes con EPOC grave. Este mecanismo probablemente co-participa con otros factores locales y sistémicos en el desarrollo de éste transtorno clínico.

## Capítulo 9

# CONCLUSIONES

---

Dentro de la aparente plétora de posibilidades fisiopatológicas de la disfunción muscular en los pacientes con EPOC, derivadas de publicaciones propias y de otros grupos de investigadores que se ha pormenorizado en la revisión y discusión de esta memoria de Tesis doctoral, es importante hacer un comentario final respecto a los trabajos incluidos en la presente memoria, que aportan aspectos novedosos y que pueden ser resumidos en **cinco** conceptos.

**Primero**, el estado nutricional, evaluado como índice de masa corporal, ha sido la aproximación más utilizada por la mayoría de los investigadores para justificar el problema de disfunción muscular en los pacientes con EPOC, pero está preservado en la gran mayoría de pacientes de la región mediterránea. **En segundo lugar**, y a pesar de esta relativa preservación de la masa muscular, los pacientes muestran tanto una debilidad global como una marcada susceptibilidad a la fatiga muscular periférica. Esto hace suponer la existencia de mecanismos más complejos que simplemente la malnutrición dentro de la fisiopatología de la disfunción muscular en la EPOC. **En tercer lugar**, nuestros análisis estructurales demuestran que las fibras del cuádriceps (músculo periférico evaluado en la mayoría de estudios por otros autores) tienen preservado su tamaño y densidad capilar. En el mismo sentido, esto hace suponer que existen mecanismos protectores frente a la atrofia, ya sea intrínsecos al individuo o medioambientales. Al mismo tiempo sugiere que la fisiopatología del trastorno funcional incluye mecanismos menos groseros que la simple atrofia muscular. Precisamente **en cuarto lugar**, creemos que esto resalta la

relevancia de lo aportado por esta memoria, en la que se confirma que existen alteraciones en la integridad de la membrana y estructuras subcelulares en las fibras de los músculos periféricos de los pacientes con EPOC. Esta alteración estructural además correlacionó con la fuerza y la resistencia del músculo estudiado. Este **daño muscular**, que había sido descrito previamente por nuestro grupo en el diafragma de los pacientes con EPOC, hace postular que algunos factores sistémicos se hallen involucrados en la aparición y perpetuación de estos trastornos. **En quinto lugar** esta memoria incluye aportaciones novedosas que permiten suponer que los mediadores inflamatorios pueden estar involucrados en los procesos de daño pero también de reparación de los músculos de estos pacientes. De hecho, los músculos inspiratorios (evaluados a través del intercostal externo) mostraron un incremento o una marcada tendencia al aumento de la expresión de los niveles de ARNm y proteína de las citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en pacientes con EPOC grave. Estos músculos, que además tendían a mostrar más daño sarcolémico, son precisamente los que mejor se adaptan fenotípicamente en los pacientes con EPOC (Gea, J.G.; 1997).

Los trabajos de investigación incluidos en esta memoria han permitido, pues, responder a interrogantes específicos pero, indudablemente, han dado origen a nuevas preguntas. Por otra parte, es importante enfatizar que dentro de los criterios de selección, identificación y reclutamiento de pacientes con EPOC se consideró como condición *sin equa non* que existiera el antecedente de exposición crónica al humo de cigarrillo. Esto nos obliga a ser cau-

tos respecto a la extrapolación directa de los resultados a pacientes con patologías bronco-obstructivas crónicas asociadas a otras exposiciones (p.e. humo de leña) o relacionadas con factores etiopatogénicos diferentes (p.e. asma persistente, sarcoidosis, etc.).

Aunque de forma especulativa, es posible que en los próximos años los avances en el campo de la disfunción muscular en pacientes con EPOC permitan precisar los aspectos ligados al *milieu* interno y los factores medioambientales que en la zona mediterránea parecen justificar diferencias fenotípicas relevantes y diferenciales de los pacientes, al comparar con otros países europeos o americanos.

Sin embargo, es importante resaltar una teoría generada recientemente por nuestro grupo en relación con la ausencia de un único factor perenne que justifique las alteraciones morfo-funcionales en los músculos respiratorios y periféricos de los pacientes con EPOC. Muchos de estos factores pueden ser transitorios (p.e. infecciones, encajamiento durante las agudizaciones de la EPOC) mientras que otros parecen ser persistentes pero de bajo grado (p.e. mediadores inflamatorios). Estos factores relacionados con la proteólisis y disfunción celular muscular pueden activarse o inactivarse periódicamente por factores extrínsecos (p.e.

actividad física, dieta, medicamentos) o intrínsecos (p.e. cambios en el metabolismo de las proteínas o utilización de macro-micronutrientes). Esto nos hace organizar o plasmar la existencia de mecanismos potenciales múltiples de pérdida de proteínas musculares que se activan e inactivan dependiendo del individuo, la alteración funcional respiratoria y la existencia de factores adyuvantes en un momento determinado. Esto puede ser ejemplificado como una analogía con las torres de extracción y un pozo de petróleo, respectivamente, "**Teoría del Pozo de Petróleo**" (Orozco-Levi, M. *et al.*; 2006b). Las implicaciones de esta analogía es que reflejan un escepticismo relativo en que exista una causa única aplicable para todos los pacientes con EPOC. Probablemente la explicación generalizable sí esté en relación con un mecanismo común (más que una causa única) de necrosis, autofagia y apoptosis (necroapoptosis) celular.

*Para terminar, permítanme señalar que, indudablemente, más del 95% de los casos de EPOC están justificados por el consumo de cigarrillo... si el tabaquismo como enfermedad adictiva hubiese sido evitada es posible que toda la investigación de esta memoria no hubiese tenido lugar...*



## Capítulo 10

# EXPECTATIVAS FUTURAS

---

A partir del aprendizaje durante mi entrenamiento pre-doctoral, me he apropiado de conocimientos y he empezado a utilizar herramientas que me permitirán desenvolverme mejor tanto a nivel profesional como personal. En este ámbito, y tratando de comprender los factores desencadenantes y perpetuadores de la disfunción muscular en los pacientes con EPOC, hemos generado varias preguntas que tendremos que responder en un plazo mediano.

La primera de ellas tiene que ver con la predisposición genética a la disfunción muscular. Sabemos que no todos los individuos fumadores desarrollan la EPOC y que el grado de afectación referente a disfunción muscular en los enfermos con EPOC es muy variable, por lo que sospechamos que el bagaje genético y su relación con factores medio-ambientales tiene que ver con el mayor o menor grado de deterioro de los parámetros funcionales musculares como es fuerza y tolerancia al ejercicio. Para resolver esta incógnita, hemos empezado un estudio, del que ya hay algunos resultados preliminares y que se han presentado en el año 2005 en congresos internacionales (en forma de comunicación oral en la 100ª Conferencia Internacional de la Sociedad Americana del Tórax en San Diego y de discusión de póster en el 15º Congreso de la Sociedad Europea Respiratoria en Copenhague). Brevemente, dichos resultados sugieren que la expresión de los alelos  $DQ\beta 1^*02$  o  $DQ\beta 1^*03$  o  $DQ\beta 1^*04$  ofrecen un genotipo protector a los pacientes que lo expresan ya que poseen mayor fuerza y resistencia al ejercicio, tanto a nivel de músculos periféricos (cuádriceps), como de músculos respiratorios (intercostal externo).

Continuando con el tema de la etiopatogenia de la disfunción muscular, se han presentado una comunicación oral en la 100ª Conferencia Internacional de la Sociedad Americana del Tórax en San Diego y un póster en el 15º Congreso de la Sociedad Europea Respiratoria en Copenhague, donde se valoran el papel de la expresión de 36 citocinas pro y anti-inflamatorias en el músculo cuádriceps de pacientes con EPOC grave, tanto con bajo IMC como con IMC preservado, se utiliza la técnica de *micro-arrays* de anticuerpos contra las mencionadas citocinas, y se ha demostrado que hay un perfil determinado, ya que en los pacientes con bajo IMC más de la mitad de las citocinas estaban disminuidas o no fue posible su detección, lo que sugiere que la expresión o no de estas moléculas juegan un papel local determinante para la preservación o pérdida de la masa muscular.

Además, hemos comenzado una nueva línea de investigación que trata de entender el proceso de perpetuación de la EPOC y para eso estamos estudiando la expresión de las moléculas MIC-A en el epitelio bronquial de los pacientes con EPOC. Los resultados preliminares han sido presentados en forma de póster en la 100ª Conferencia Internacional de la Sociedad Torácica Americana en San Diego y de una comunicación oral en el 15º Congreso de la Sociedad Europea Respiratoria en Copenhague. Hay que enfatizar que este es el primer estudio donde se muestra la expresión de las moléculas MIC-A en epitelio bronquial humano y asociado específicamente al hábito tabáquico, ya que los individuos no fumadores no expresan estas moléculas en su epitelio bronquial. Esta evidencia sugiere el papel

de algunos mecanismos autoinmunitarios que podrían perpetuar el proceso inflamatorio, a pesar de que el paciente deje de fumar.

En las páginas siguientes se adjuntan los pósters presentados en cada uno de los congresos mencionados anteriormente, donde se amplía un poco la información y se muestran de manera agradable los datos derivados de estas investigaciones iniciales.

No quiero terminar esta memoria de Tesis Doctoral sin mencionar que hay muchas preguntas por responder en el campo de la disfunción muscular en los pacientes con EPOC, tanto en su etiología como su fisiopatología. Espero que esos interrogantes y las preguntas que ha generado esta Tesis sean respondidos en un plazo mediano por grupos líderes en la investigación de patologías musculares como es el caso de la ***Unitat de Recerca en Múscul i Aparell Respiratori***, centro en el que me he formado y del cual me llevo recuerdos gratos.

**FIN**

***Carlos G Coronell***

*Licenciado en Medicina y Cirugía*

*Unitat de Recerca en Múscul i Aparell Respiratori (IMIM)*

*Laboratori de Fisiopatologia Respiratòria*

*Servei de Pneumologia*

*Hospital del Mar*

## Expression of MIC-A in bronchial epithelium associates with cigarette smoking: A Sign of Induced Autoimmune Mechanisms?

Mauricio Orozco-Levi, Benediceta Abejón, Carlos Coronell, Alba Ramirez-Sarmiento, Guadalupe Ercilla, Edmond Yunis, Joaquim Gea, Victor Cunill  
*Unidad de Investigación Muscular y Respiratoria, IMM Unidad de Endoscopia Respiratoria, Servicio de Neumología, Hospital del Mar, Universidad Pompeu Fabra, Dana Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, USA.*

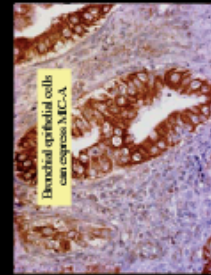
### Hypothesis

- Exposure to inhaled irritants (e.g., cigarette smoke) induces epithelial cellular stress, hence it is possible that...
  - cigarette smoke causes MIC-A expression in susceptible smokers.
  - and MIC-A expression associates with susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

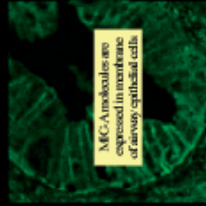
### Population

- Patients:
  - 66 patients (PEV) (range 21 to 118 y old)
  - According to Smoking:
    - Chronic smokers (n=30)
    - Former smokers (n=6)
    - Non-smokers (n=30)
  - According to Airway function:
    - Chronic obstructive COPD (n=27)
    - Normal (n=39)
- Bronchial biopsies:
  - Fiberbronchoscopy

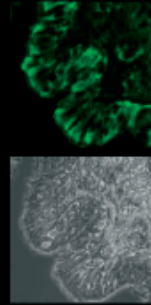
### Human tissue immunohistochemistry



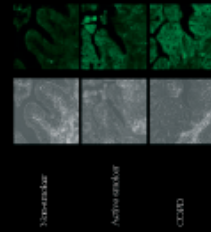
### Results 2 Confocal microscopy of bronchial biopsies using anti-MIC-A Abs



### Results 3 MIC-A in bronchoscopic biopsies



### Results 4 Variable levels of MIC-A expression



### Results 5 Associations

- MIC-A molecules were detected in bronchial epithelial cells from:
- 16% of controls (non-smokers, non-COPD)
  - 52% of former or active smokers
  - Active smoking associated with MIC-A expression in 59% of patients
  - This increased frequency remains in 45% of patients despite quitting smoking.

### Consistency

- MIC-A genes has been associated with:
- Griff negative
  - Intestinal inflammatory disease (celiac disease)
  - Autoimmunity: Diabetes mellitus I, Addison's disease
  - Mucosal infection (toxoplasma or virus)
  - Neylsons: psoriasis, alopecia, asticytoma
  - Hypothese: Does COPD have an autoimmune component?* (Gea A, Li L, Yunis J, Drenthorn K, Cronin L, Thara, 2003, 38, 832-4)

### Conclusions This study shows...

- MIC-A genes can be expressed in human bronchial epithelium related to:
- chronic exposure to cigarette smoke
  - presence of COPD (even despite quitting smoking)
- This evidence supports that autoimmune mechanisms could play a role in pathobiologic inflammatory mechanisms in patients susceptible to COPD.*

# Description of the cytokine profile using antibody arrays of peripheral muscles in severe COPD patients

E. Barreiro, B. de la Puente, C. Coronell, M. Polkey, A. M. Schols, J. Gea (Barcelona, Spain; London, United Kingdom; Maastricht, Netherlands)

## METHODS

- Clinical Assessment
- Nutritional Evaluation
- Pulmonary Function Testing
- Exercise Capacity
- Muscle function

27 patients with severe COPD  
2 healthy control individuals



## RESULTS

17 Significant differences in cytokine protein levels in either low BMI or low muscle BMI severe COPD patients versus control subjects

Cytokine	Severe COPD		Control	
	Low BMI	Low Muscle BMI	Low BMI	Low Muscle BMI
IL-1β	1.2	1.5	1.8	2.1
IL-2	0.8	1.0	1.2	1.4
IL-4	0.5	0.6	0.7	0.8
IL-6	1.5	1.8	2.1	2.4
IL-8	0.3	0.4	0.5	0.6
IL-10	0.2	0.3	0.4	0.5
IL-17	0.1	0.2	0.3	0.4
IL-18	0.1	0.2	0.3	0.4

## BACKGROUND

- It has recently been proposed that several cytokines might be involved in the process of muscle wasting, which in turn is associated with muscle dysfunction and poor exercise tolerance in patients with COPD (Schols et al., 2005; Barreiro et al., 2010).
- Serum levels of TNF-α were higher in severe COPD patients with weight loss compared with a range of patients with the same degree of chronic activity and normal weight (Schols et al., 2005).
- COPD patients showing increased resting energy expenditure and reduced fat-free mass had greater levels of acute phase reactant proteins and inflammatory cytokines in their serum (Barreiro et al., 2010).
- Patients with stable COPD and low body mass index (BMI) showed reduced circulating levels of leptin, which were related to their BMI. Moreover, plasma levels of leptin in these patients were independent of the TNF-α levels (Barreiro et al., 2010).
- Stable COPD patients with low weight and hypoxemia showed increased plasma levels of TNF-α, and both soluble TNF-receptors (TNF-R1 and TNF-R2). In these patients, p40 levels were inversely related to other circulating TNF-α or soluble TNF-receptors (Barreiro et al., 2010).
- Severe COPD patients showed increased plasma TNF-α levels and other proinflammatory cytokines that were not modified by previous exercise training (Barreiro et al., 2010).

## HYPOTHESIS

On this basis, we hypothesized that limb muscles of patients with severe COPD might also exhibit an abnormal cytokine profile compared with that of muscles from control subjects.

## OBJECTIVES

- To assess the protein level of several cytokines using cytokine antibody arrays in the quadriceps muscles of each patient with severe COPD and healthy control subjects.
- To explore whether the muscle protein cytokine profile differed among the severe COPD patients according to their body weight.

## Interferon Gamma (IFN-γ)



## Transforming Growth Factor Beta (TGF-β)



## Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)



## Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF-α)



## Interleukin-6 (IL-6)



## LEPTIN



## CONCLUSIONS

- To the best of our knowledge, no other studies are yet available exploring the expression of several cytokines in a comparative manner in the limb muscles of patients with severe COPD.
- Cytokine profile in the quadriceps of severe COPD patients with low BMI is differentially regulated, suggesting a major role for local cytokines in muscle phenotype and weight loss.
- It is worth noting that inflammatory cytokines were downregulated in the muscles of severe COPD patients with weight loss, and this is precisely the contrary to current hypothesis on peripheral muscle phenotype and function. This finding might be explained by the attributed effects of cytokines on tissue remodeling.

# Muscle dysfunction in COPD patients associates with HLA system: Risk and protective genotypes

Orozco-Lavi M, Coronelli C, Ramírez-Sarmiento A, Ercilla G, Clavijo O, Yunis E, Gra J

Muscle and Respiratory Research Unit, IMIM, Respiratory Department, Hospital del Mar, Barcelona, Universitat Pompeu Fabra, Immunology Department, Hospital Clinic, Barcelona, Spain; Dana-Farber Cancer Institute, Harvard University, USA.

### Background

- Patients with COPD show lower strength and endurance of skeletal muscles not only in advanced but also in early stages of the disease (ATS/ERS consensus, 1999; Coronelli et al, ERJ 2004).
- The ultimate cause of this muscle dysfunction is still unknown.

### Hypothesis

We hypothesised that a potential association could exist between HLA class II alleles and muscle function (strength and endurance) of both respiratory and peripheral muscles in stable and non-comorbid COPD patients.

### Study subjects

**Total:** 90 patients.

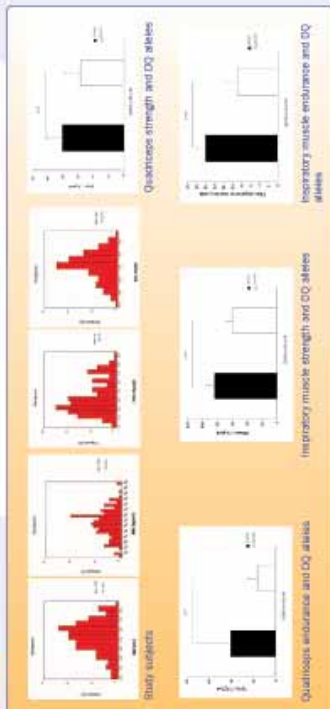
**Selection criteria:** For a patient to be enrolled as a study subject, the following criteria should be present:

- Gender: Male individuals,
- Age: 40 or more yrs of age,
- Smoking status: former or current,
- Criteria for stable COPD,
- No significant comorbidity.

### Measurements

- **Non-invasive techniques:**
  - Nutritional status - anthropometry,
  - Pulmonary function tests,
  - Respiratory and peripheral muscle function:
    - strength,
    - endurance.
- **HLA typing**
  - Peripheral blood sampling for DNA extraction,
  - HLA-DQB1 typing was performed on DNA purified extracts using both SSOP and nucleotide sequence analyses.

### Results



### Summary

Expression of DQB1\*05 or \*06 associated with lower endurance of the quadriceps (-116%) and lower muscle strength (-56%) and endurance (-67%) of inspiratory muscles. Expression of DQB1\*02, \*03 or \*04 associated with greater strength and endurance of quadriceps (+37 and +141%) and inspiratory muscles (+22 and +63%), not explained by differences in pulmonary function tests, nutrition, physical activity or age.

### Conclusions

- This is the first study showing a link between muscle dysfunction and HLA system in COPD.
- Susceptibility to global muscle dysfunction is increased in patients with DQB1\*05 or \*06 ("risk genotype"), and decreased in patients with DQB1\*02 or \*03 or \*04 alleles ("protective genotype").

These associations suggest that HLA system can modify the phenotype of COPD patients.

Grant: ERESMA-CLIN-2003-02259 ARMAR RS-01,1324 Red Respiria RIC-003,011.





## BIBLIOGRAFIA

1. Aguar, M.C. Estructura i funció dels músculs respiratoris en la MPOC. Desenvolupament d'un model de biòpsia ambulatoria. *Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona*.1995.
2. Aguar, M.C., Gea, J., Gallart, L., Orozco-Levi, M., Broquetas, J.M. Expiratory maneuvers and respiratory muscle strength in healthy subjects. *Eur Respir J*. 1994;7:340S.
3. Agustí, A.G. COPD, a multicomponent disease: implications for management. *Respir Med*. 2005;99:670-682.
4. Agustí, A.G., Noguera, A., Sauleda, J., Sala, E., Pons, J., Busquets, X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2003;21:347-360.
5. American Thoracic Society. Chronic bronchitis, asthma and pulmonary emphysema. A statement by the Committee on diagnostic standards for nontuberculous respiratory diseases. *Am Rev Respir Dis*. 1962;85:762-768.
6. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152: S77-S121.
7. American Thoracic Society and European Respiratory Society. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: a statement of the American Thoracic Society and European Respiratory Society. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:S1-S40.
8. American Thoracic Society/European Respiratory Society Definition, Diagnosis and Staging of COPD. [revisado el 24 de Mayo de 2004]. Disponible en: <http://www.thoracic.org/COPD/1/definitions.asp>
9. Andersen, J.L., Klitgaard, H., Bangsbo, J., Saltin, B. Myosin heavy chain isoforms in single fibres from m. vastus lateralis of soccer players: effects of strength-training. *Acta Physiol Scand*. 1994a;150:21-26.
10. Andersen, J.L., Klitgaard, H., Saltin, B. Myosin heavy chain isoforms in single fibres from m. vastus lateralis of sprinters: influence of training. *Acta Physiol Scand*. 1994b;151:135-142.
11. Andersen, J.L., Mohr, T., Biering-Sorensen, F., Galbo, H., Kjaer, M. Myosin heavy chain isoform transformation in single fibres from m. vastus lateralis in spinal cord injured individuals: effects of long-term functional electrical stimulation (FES). *Pflugers Arch*. 1996;431:513-518.
12. Andersen, J.L., Terzis, G., Kryger, A. Increase in the degree of coexpression of myosin heavy chain isoforms in skeletal muscle fibers of the very old. *Muscle Nerve*. 1999;22:449-454.
13. Aran, X. Els Músculs Respiratoris a la Síndrome d'apnees del son. *Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona*. 1992a.
14. Aran, X., Gea, J., Aguar, M.C., Guiu, R., Orozco-Levi, M., Broquetas, J.M. Utilidad del índice de relajación máxima (MMR) en la valoración de la fatiga del diafragma en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica en fase estable. *Arch Bronconeumol*. 1992b;28:18.
15. Aran, X., Gea, J., Gea, J., Guiu, R., Sauleda, J., Aguar, M.C., Broquetas, J.M. Comparación de tres maniobras diferentes para la obtención de la presión transdiafragmática máxima. *Arch Bronconeumol*. 1992c;28:112-115.
16. Aran, X., Gea, J., Orozco-Levi, M., Felez, M., Broquetas, J.M. Endurance of the respiratory muscles is impaired in patients with sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151:A809.
17. Arora, N.S. Rochester, D.F. Effect of body weight and muscularity on human diaphragm muscle mass, thickness, and area. *J Appl. Physiol*. 1982;52:64-70.
18. Baarends, E.M., Schols, A.M., Mostert, R., Wouters, E.F. Peak exercise response in relation to tissue depletion in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 1997;10:2807-2813.
19. Badham, C. An essay on bronchitis with a supplement containing remarks on simple pulmonary abscess. 2ª ed. Callow Eds. London, 1814:25-45.
20. Banzett, R.B., Topulos, G.P., Leith, D.E., Nations, C.S. Bracing arms increases the capacity for sustained hyperpnea. *Am Rev Respir Dis*. 1988;138:106-109.
21. Barbera, J.A., Peces-Barba, G., Agustí, A.G., Izquierdo, J.L., Monso, E., Montemayor, T., Viejo, J.L. [Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of chronic obstructive pulmonary disease]. *Arch. Bronconeumol*. 2001;37:297-316.
22. Barnes, P.J. Mediators of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Pharmacol Rev*. 2004;56:515-548.
23. Barnes, P.J. New approaches to COPD. *European Respiratory Review*. 2005;14:2-11.
24. Barreiro, E., Ferrer, A., Hernandez, N., Palacio, J., Broquetas, J.M., Gea, J. Expiratory function and cellular

properties of the external oblique muscle in patients with extremely severe COPD. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159 (suppl):A588.

25. Barreiro, E., Gea, J., Corominas, J.M., Hussain, S.N. Nitric oxide synthases and protein oxidation in the quadriceps femoris of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol.Biol.* 2003;29:771-778.

26. Barreiro, E., de la, P.B., Minguella, J., Corominas, J.M., Serrano, S., Hussain, S.N., Gea, J. Oxidative stress and respiratory muscle dysfunction in severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005a;171:1116-1124.

27. Barreiro, E., Gea, J., Matar, G., Hussain, S.N. Expression and Carbonylation of Creative Kinase in the Quadriceps Femoris Muscles of COPD Patients. *Am J Respir Cell Mol.Biol.* 2005b;33:636-642.

28. Bate-Smith, E.C., Bendall, J.R. Rigor mortis and adenosin-triphosphate. *J Physiol.* 1947;106:177-185.

29. Begin, P., Grassino, A. Inspiratory muscle dysfunction and chronic hypercapnia in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis.* 1991;143:905-912.

30. Bellemare, F., Grassino, A. Effect of pressure and timing of contraction on human diaphragm fatigue. *J Appl Physiol.* 1982;53:1190-1195.

31. Bellemare, F., Grassino, A. Force reserve of the diaphragm in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Appl.Physiol.* 1983;55:8-15.

32. Bernard, S., Leblanc, P., Whittom, F., Carrier, G., Jobin, J., Belleau, R., Maltais, F. Peripheral muscle weakness in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158:629-634.

33. Bigland-Ritchie, B. Muscle fatigue and the influence of changing neural drive. *Clin Chest Med.* 1984;5:21-34.

34. Biral, D., Betto, R., Danieli-Betto, D., Salviati, G. Myosin heavy chain composition of single fibres from normal human muscle. *Biochem.J.* 1988;250:307-308.

35. Black, L.F., Hyatt, R.E. Maximal respiratory pressures: normal values and relationship to age and sex. *Am Rev Respir Dis.* 1969;99:696-702.

36. Blanco, M.L. Capacidad oxidativa de los músculos respiratorios y periféricos en la EPOC. *Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.* 2003.

37. Booth, F.W., Thomason, D.B. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol Rev.* 1991;71:541-585.

38. Brooke, M.H., Engel, W.K. The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types. 1. Adult male and female. *Neurology.* 1969;19:221-233.

39. Broquetas, J.M. Estructura y función de los músculos respiratorios en la epoc: efectos de la hipoxia, hiperoxia, hipercapnia, cambios posturales y ejercicio. *Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.*1992.

40. Brosse, J. *La Magie des Plantes.Tabac.* París. Espaces libres, 1990:286-292.

41. Bruce, E.N. Reflex changes in diaphragmatic excitation elicited by displacement of the diaphragm. *Am Rev Respir Dis.* 1979;119:61-63.

42. Buck, M., Chojkier, M. Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in a murine model of cachexia is prevented by inhibitors of nitric oxide synthesis and antioxidants. *EMBO J.* 1996;15:1753-1765.

43. Burrows, B. Airways obstructive diseases: pathogenetic mechanisms and natural histories of the disorders. *Med Clin.North Am.* 1990;74:547-559.

44. Calverley, P.M. The role of corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease. *Semin Respir Crit Care Med.* 2005;26:235-245.

45. Casaburi, R., Patessio, A., Ioli, F., Zanaboni, S., Donner, C.F., Wasserman, K. Reductions in exercise lactic acidosis and ventilation as a result of exercise training in patients with obstructive lung disease. *Am Rev Respir Dis.* 1991;143:9-18.

46. Casaburi, R., Barstow, T.J., Robinson, T., Wasserman, K. Dynamic and steady-state ventilatory and gas exchange responses to arm exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 1992;24:1365-1374.

47. Casadevall, C., Coronell, C., Ramirez-Sarmiento, A., Martinez-Llorens, J.M., Barreiro, E., Orozco-Levi, M., Gea, J. Upregulation of proinflammatory cytokine genes in the external intercostal muscles of COPD patients. *Eur Respir J.* 2006.(en revisión).

48. Casan, P. [COPD: Where Are We Coming From?]. *Arch Bronconeumol.* 2004;40:3-5.

49. Casan, P. EPOC. Aspectos históricos. [revisado el 3 de noviembre de 2005]. Disponible en: <http://www.asmayepoc.com/html/epoc/historia/perspect21.html>

50. Caskey, C.I., Zerhouni, E.A., Fishman, E.K., Rahmouni, A.D. Aging of the diaphragm: a CT study. *Radiology.* 1989;171:385-389.

51. Celli, B.R., Rassulo, J., Make, B.J. Dyssynchronous breathing during arm but not leg exercise in patients with chronic airflow obstruction. *N Engl J Med.* 1986;314:1485-1490.

52. Celli, B.R., MacNee, W. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J.* 2004;23:932-946.



53. Chen, J.C. Mannino, D.M. Worldwide epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr.Opin.Pulm. Med.* 1999;5:93-99.
54. Ciba Foundation Guest Symposium. Terminology, definitions and classification of chronic pulmonary emphysema and related conditions. *Thorax.* 1959;14:286-299.
55. Clark, C.J., Cochrane, L., Mackay, E. Low intensity peripheral muscle conditioning improves exercise tolerance and breathlessness in COPD. *Eur Respir J.* 1996;9:2590-2596.
56. Cohen, C.A., Zagelbaum, G., Gross, D., Roussos, C., Macklem, P.T. Clinical manifestations of inspiratory muscle fatigue. *Am J Med.* 1982;73:308-316.
57. Comtois, A., Gorczyca, W., Grassino, A. Anatomy of diaphragmatic circulation. *J Appl.Physiol.* 1987;62:238-244.
58. Congleton, J. The pulmonary cachexia syndrome: aspects of energy balance. *Proc.Nutr.Soc.* 1999;58:321-328.
59. Coronell, C., Orozco-Levi, M., Gea, J. COPD and body weight in a Mediterranean population. *Clin.Nutr.* 2002a;21:437-438.
60. Coronell, 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.* 2002b;38:580-584.
61. Coronell, C., Ramirez-Sarmiento, A., Nunez, Y., Broquetas, J.M., Orozco-Levi, M., Gea, J. Capillary density of the quadriceps in copd patients: an structural determinant of muscle endurance? *Eur Respir J.* 2003;A508
62. Coronell, C., Orozco-Levi, M., Mendez, R., Ramirez-Sarmiento, A., Galdiz, J.B., Gea, J. Relevance of assessing quadriceps endurance in patients with COPD. *Eur.Respir J.* 2004;24:129-136.
63. Coronell, C., Ramirez-Sarmiento, A., Lloreta, J., Martinez-Llorens, J.M., Galdiz, J.B., Gea, J., Orozco-Levi, M. Injury of peripheral muscles in susceptible smokers with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Chest.* 2006. (en revisión).
64. Coyle, E.F., Martin, W.H., Ehsani, A.A., Hagberg, J.M., Bloomfield, S.A., Sinacore, D.R., Holloszy, J.O. Blood lactate threshold in some well-trained ischemic heart disease patients. *J Appl Physiol.* 1983;54:18-23.
65. Coyle, E.F., Coggan, A.R., Hopper, M.K., Walters, T.J. Determinants of endurance in well-trained cyclists. *J Appl Physiol.* 1988;64:2622-2630.
66. Coyle, E.F. Physiological determinants of endurance exercise performance. *J Sci Med Sport.* 1999;2:181-189.
67. De Troyer, A., Sampson, M., Sigrist, S., Macklem, P.T. The diaphragm: two muscles. *Science.* 1981;213:237-238.
68. De Troyer, A., Sampson, M., Sigrist, S., Macklem, P.T. Action of costal and crural parts of the diaphragm on the rib cage in dog. *J Appl.Physiol.* 1982;53:30-39.
69. Debigare, R., Cote, C.H., Maltais, F. Peripheral muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease. Clinical relevance and mechanisms. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:1712-1717.
70. Decramer, M., Lacquet, L.M., Fagard, R., Rogiers, P. Corticosteroids contribute to muscle weakness in chronic airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;150:11-16.
71. Decramer, M., de, B., V, Dom, R. Functional and histologic picture of steroid-induced myopathy in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153:1958-1964.
72. Decramer, M., De Benedetto, F., Del Ponte, A., Marinari, S. Systemic effects of COPD. *Respir Med.* 2005;99: S3-10.
73. Dennis, R.J., Maldonado, D., Norman, S., Baena, E., Martinez, G. Woodsmoke exposure and risk for obstructive airways disease among women. *Chest.* 1996;109:115-119.
74. Derenne, J.P., Macklem, P.T., Roussos, C. The respiratory muscles: mechanics, control, and pathophysiology. *Am Rev Respir Dis.* 1978a;118:119-133.
75. Derenne, J.P., Macklem, P.T., Roussos, C. The respiratory muscles: Mechanics, control, and pathophysiology. Part 2. *Am Rev Respir Dis.* 1978b;118:373-390.
76. Derenne, J.P., Macklem, P.T., Roussos, C. The respiratory muscles: mechanics, control, and pathophysiology. Part III. *Am Rev Respir Dis.* 1978c;118:581-601.
77. Desplanches, D., Hoppeler, H., Tuscher, L., Mayet, M.H., Spielvogel, H., Ferretti, G., Kayser, B., Leuenberger, M., Grunenfelder, A., Favier, R. Muscle tissue adaptations of high-altitude natives to training in chronic hypoxia or acute normoxia. *J Appl Physiol.* 1996;81:1946-1951.
78. Dodd, D.S., Brancatisano, T., Engel, L.A. Chest wall mechanics during exercise in patients with severe chronic air-flow obstruction. *Am Rev Respir Dis.* 1984;129:33-38.
79. Dubowitz, V., Brooke, M.H. Muscle biopsy: a modern approach. En: major problems in neurology. V. Dubowitz y MH. Brooke Eds. London: Saunders, 1973:74-85.
80. Edición Digital "Desde la semilla al humo" El tabaco negro en Pinar del Rio. [revisado el 21 de septiembre de 2005]. Disponible en: [http://www.guerrillero.co.cu/sitiotabaco/historia/elhallazgo\\_a.htm](http://www.guerrillero.co.cu/sitiotabaco/historia/elhallazgo_a.htm)

81. Edwards, R.H., Young, A., Hosking, G.P., and Jones, D.A. Human skeletal muscle function: description of tests and normal values. *Clin Sci Mol Med.* 1977;52:283-290.
82. Edwards, R.H.T., Faulkner, J.A. Structure and function of the respiratory muscles. En: *The Thorax*. Roussos C, Macklem PT, Eds. Marcel Dekker, N.Y., 1986:297-326.
83. Engelen, M.P., Schols, A.M., DOES, J.D., Gosker, H.R., Deutz, N.E., Wouters, E.F. Exercise-induced lactate increase in relation to muscle substrates in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:1697-1704.
84. Epstein, S.K. An overview of respiratory muscle function. *Clin Chest Med.* 1994;15:619-639.
85. Esau, S.A., Bellemare, F., Grassino, A., Permutt, S., Roussos, C.H., Pardy, R.L. Changes in relaxation rate with diaphragmatic fatigue in humans. *J Appl Physiol.* 1983a;54:1353-1360.
86. Esau, S.A., Bye, P.T., Pardy, R.L. Changes in rate of relaxation of sniffs with diaphragmatic fatigue in humans. *J Appl Physiol.* 1983b;55:731-735.
87. Evans, A.B., Al Himyary, A.J., Hrovat, M.I., Pappagianopoulos, P., Wain, J.C., Ginns, L.C., Systrom, D.M. Abnormal skeletal muscle oxidative capacity after lung transplantation by 31P-MRS. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;155:615-621.
88. Falkel, J. Plantar flexor strength testing using the cybex isokinetic dynamometer. *Phys.Ther.* 1978;58:847-850.
89. Farkas, G.A. Roussos, C. Adaptability of the hamster diaphragm to exercise and/or emphysema. *J Appl.Physiol.* 1982;53:1263-1272.
90. Farrell, P.A., Wilmore, J.H., Coyle, E.F., Billing, J.E., Costill, D.L. Plasma lactate accumulation and distance running performance. *Med Sci Sports.* 1979;11:338-344.
91. Fisher, N.M., Pendergast, D.R., Calkins, E.C. Maximal isometric torque of knee extension as a function of muscle length in subjects of advancing age. *Arch Phys.Med Rehabil.* 1990;71:729-734.
92. Fiz, J.A., Comtois, N., Salazkin, I., Galdiz, B., Morera, J., Grassino, A. Non invasive respiratory monitoring of diaphragm muscle with surface accelerometers animal model (Dogs). *Eur Respir J.* 1995;8:191S.
93. Fiz, J.A., Romero, P., Gomez, R., Hernandez, M.C., Ruiz, J., Izquierdo, J., Coll, R., Morera, J. Indices of respiratory muscle endurance in healthy subjects. *Respiration.* 1998;65:21-27.
94. Fletcher, C.M., Peto, R., Tinker, C., Speizer, F.E. *The Natural History of Chronic Obstructive Lung Disease in Working Men in London.* Oxford University Press, New York., 1976.
95. Flores, E.A., Bistran, B.R., Pomposelli, J.J., Dinarello, C.A., Blackburn, G.L., Istfan, N.W. Infusion of tumor necrosis factor/cachectin promotes muscle catabolism in the rat. A synergistic effect with interleukin 1. *J Clin Invest.* 1989;83:1614-1622.
96. Franssen, F.M., Wouters, E.F., Schols, A.M. The contribution of starvation, deconditioning and ageing to the observed alterations in peripheral skeletal muscle in chronic organ diseases. *Clin Nutr.* 2002;21:1-14.
97. Galdiz, J., Comtois, N., Salazkin, I., Sinderby, C., Grassino, A. Different drive to left and right diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;151:A585.
98. Gallart, L., Gea, J., Aguar, M.C., Broquetas, J.M., Puig, M.M. Effects of interpleural bupivacaine on respiratory muscle strength and pulmonary function. *Anesthesiology.* 1995;83:48-55.
99. Gan, W.Q., Man, S.F.P., Senthilselvan, A., Sin, D.D. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax.* 2004;59:574-580.
100. Garcia, R. *El arte de fumar. Tabacología Universal.* París. Librería Española de Garnier hermanos., 1881.
101. Garcia-Aymerich, J., Barreiro, E., Ferrero, E., Marrades, R.M., Morera, J., Anto, J.M. Patients hospitalized for COPD have a high prevalence of modifiable risk factors for exacerbation (EFRAM study). *Eur Respir J.* 2000;16:1037-1042.
102. Gea, J., Aran, X., Orozco-Levi, M., Sauleda, J., Aguar, M.C., Broquetas, J.M. Comparación entre los diversos métodos de evaluación de la presión transdiaphragmática: utilidad en pacientes con epoc. *Arch Bronconeumol.* 1993a;29:328-331.
103. Gea, J., Espadaler, J.M., Guiu, R., Aran, X., Seoane, L., Broquetas, J.M. Diaphragmatic activity induced by cortical stimulation: surface versus esophageal electrodes. *J Appl.Physiol.* 1993b;74:655-658.
104. Gea, J., Orozco-Levi, M., Aguar, M.C., Aran, X., Sauleda, J., Broquetas, J.M. Modificación de la maniobra de sniff para la determinación de la pdi máxima en pacientes conectados a circuitos respiratorios externos. *Arch Bronconeumol.* 1993c;29:168-170.
105. Gea, J.G. Myosin gene expression in the respiratory muscles. *Eur.Respir J.* 1997;10:2404-2410.
106. 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;56:214-224.
107. Gertz, I., Hedenstierna, G., Hellers, G., Wahren, J. Muscle metabolism in patients with chronic obstructive

- lung disease and acute respiratory failure. *Clin Sci Mol. Med.* 1977;52:396-403.
108. Gibson, G.J. Diaphragmatic paresis: pathophysiology, clinical features, and investigation. *Thorax.* 1989;44:960-970.
109. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *The GOLD Workshop Report.* 2005. [revisado el 14 de noviembre de 2005]. Disponible en: <http://www.goldcopd.com/Guidelineitem.asp?l1=2&l2=1&intId=989>
110. Gold, D.R., Tager, I.B., Weiss, S.T., Tosteson, T.D., Speizer, F.E. Acute lower respiratory illness in childhood as a predictor of lung function and chronic respiratory symptoms. *Am Rev Respir Dis.* 1989;140:877-884.
111. Gorini, M., Misuri, G., Duranti, R., Iandelli, I., Mancini, M., Scano, G. Abdominal muscle recruitment and PEEPi during bronchoconstriction in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 1997;52:355-361.
112. Gosselink, R., Troosters, T., Decramer, M. Peripheral muscle weakness contributes to exercise limitation in COPD. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153:976-980.
113. Gosselink, R., Troosters, T., Decramer, M. Peripheral muscle weakness in upper and lower extremities in COPD patients. *Eur Respir J.* 1998;12:S345.
114. Gosselink, R., Troosters, T., Decramer, M. Distribution of muscle weakness in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *J Cardiopulm. Rehabil.* 2000;20:353-360.
115. Gozlan, G., Bensoussan, L., Coudreuse, J.M., Fondarai, J., Gremeaux, V., Viton, J.M., Delarque, A. [Isokinetic dynamometer measurement of shoulder rotational strength in healthy elite athletes (swimming, volley-ball, tennis): comparison between dominant and nondominant shoulder.]. *Ann Readapt. Med Phys.* 2006;49:8-15.
116. Grund, A., Krause, H., Kraus, M., Siewers, M., Rieckert, H., Muller, M.J. Association between different attributes of physical activity and fat mass in untrained, endurance- and resistance-trained men. *Eur J Appl Physiol.* 2001;84:310-320.
117. Guyton, A.C. Hall, J.E. Skeletal muscle physiology, en *Textbook of Medical Physiology*, Eds. W B Saunders Co, 10th Edition, 2000:79-93.
118. Hagberg, J.M. Coyle, E.F. Physiological determinants of endurance performance as studied in competitive racewalkers. *Med Sci Sports Exerc.* 1983;15:287-289.
119. Hall-Angeras, M., Angeras, U., Zamir, O., Hasselgren, P.O., Fischer, J.E. Interaction between corticosterone and tumor necrosis factor stimulated protein breakdown in rat skeletal muscle, similar to sepsis. *Surgery.* 1990;108:460-466.
120. Hamilton, A.L., Killian, K.J., Summers, E., Jones, N.L. Muscle strength, symptom intensity, and exercise capacity in patients with cardiorespiratory disorders. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;152:2021-2031.
121. Hansel, T.T. Barnes, P.J. Atlas de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, EPOC. 1ª Ed. Londres: The Parthenon Publishing Group, 2005:1-19.
122. Hards, J.M., Reid, W.D., Parry, R.L., Pare, P.D. Respiratory muscle fiber morphometry. Correlation with pulmonary function and nutrition. *Chest.* 1990;97:1037-1044.
123. Hayot, M., Michaud, A., Koechlin, C., Caron, M.A., Leblanc, P., Prefaut, C., Maltais, F. Skeletal muscle micro biopsy: a validation study of a minimally invasive technique. *Eur Respir J.* 2005;25:431-440.
124. Henriksson-Larsen, K.B., Lexell, J., Sjöström, M. Distribution of different fibre types in human skeletal muscles. I. Method for the preparation and analysis of cross-sections of whole tibialis anterior. *Histochem. J.* 1983;15:167-178.
125. Héritier, F., Perret, C., Lauenberger, P.H., Fitting, J.W. Assessment of inspiratory muscle strength by the sniff nasal inspiratory pressure (SNIP). *Am Rev Respir Dis.* 1992;145:A257.
126. Hernandez, N., Orozco-Levi, M., Barreiro, E., Lloreta, J., Ferrer, A., Broquetas, J.M., Gea, J. Cambios en la estructura muscular en pacientes con EPOC: Evidencias que soportan la "teoría de los compartimentos". *Arch Bronconeumol.* 2001;37 (supl 1):18.
127. Hernandez, N., Orozco-Levi, M., Belalcazar, V., Pasto, M., Minguella, J., Broquetas, J.M., Gea, J. Dual morphometrical changes of the deltoid muscle in patients with COPD. *Respir Physiol Neurobiol.* 2003;134:219-229.
128. Higgins, M. Risk factors associated with chronic obstructive lung disease. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 1991;624:7-17.
129. Hildebrand, I.L., Sylven, C., Esbjörnsson, M., Hellström, K., Jansson, E. Does chronic hypoxaemia induce transformations of fibre types? *Acta Physiol Scand.* 1991;141:435-439.
130. Hill, N.S., Eveloff, S.E., Carlisle, C.C., Goff, S.G. Efficacy of nocturnal nasal ventilation in patients with restrictive thoracic disease. *Am Rev Respir Dis.* 1992;145:365-371.
131. Hillman, T.E., Nunes, Q.M., Hornby, S.T., Stanga, Z., Neal, K.R., Rowlands, B.J., Allison, S.P., Lobo, D.N. A practical posture for hand grip dynamometry in the clinical setting. *Clin Nutr.* 2005;24:224-228.

132. Hornby, S.T., Nunes, Q.M., Hillman, T.E., Stanga, Z., Neal, K.R., Rowlands, B.J., Allison, S.P., Lobo, D.N. Relationships between structural and functional measures of nutritional status in a normally nourished population. *Clin Nutr.* 2005;24:421-426.
133. Hughes, R.L., Katz, H., Sahgal, V., Campbell, J.A., Hartz, R., Shields, T.W. Fiber size and energy metabolites in five separate muscles from patients with chronic obstructive lung diseases. *Respiration.* 1983;44:321-328.
134. Humphreys, P.W. Lind, A.R. The blood flow through active and inactive muscles of the forearm during sustained hand-grip contractions. *J Physiol.* 1963;166:120-135.
135. Hutchinson, J. On the capacity of the lungs and on the respiratory functions, with a view of establishing a precise and easy method of detecting disease by the spirometer. *Med Chir Trans.* 1846;2:II:137-252.
136. Ishikawa, S. Hayes, J.A. Functional morphotometry of the diaphragm in patients with chronic obstructive lung disease. *Am Rev Respir Dis.* 1973;108:135-138.
137. Iversen, P. The occurrence of myosin heavy chain isoforms in human skeletal muscle: characterisation of atrophic muscle tissue from patients with knee arthritis and the effects of ethanol and thyroid hormone. Tesis de MSc., Instituto August Krogh, Universidad de Copenague.1992.
138. Izquierdo, J.L. The burden of COPD in Spain: results from the Confronting COPD survey. *Respir Med.* 2003;97 Suppl C:S61-S69.
139. Jackson, M.J. O'Farrell, S. Free radicals and muscle damage. *Br.Med Bull.* 1993;49:630-641.
140. Jacobson, L., Hertzman, P., Lofdahl, C.G., Skoogh, B.E., Lindgren, B. The economic impact of asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in Sweden in 1980 and 1991. *Respir Med.* 2000;94:247-255.
141. Jaen, A., Ferrer, A., Ormaza, I., Rue, M., Domingo, C., Marin, A. [Prevalence of chronic bronchitis, asthma and airflow limitation in an urban-industrial area of Catalonia]. *Arch Bronconeumol.* 1999;35:122-128.
142. 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;151:374-377.
143. Jammes, Y., Buchler, B., Delpierre, S., Rasidakis, A., Grimaud, C., Roussos, C. Phrenic afferents and their role in inspiratory control. *J Appl.Physiol.* 1986;60:854-860.
144. Jaworowski, A., Porter, M.M., Holmback, A.M., Downham, D., Lexell, J. Enzyme activities in the tibialis anterior muscle of young moderately active men and women: relationship with body composition, muscle cross-sectional area and fibre type composition. *Acta Physiol Scand.* 2002;176:215-225.
145. Jeejeebhoy, K.N. How should we monitor nutritional support: structure or function? *New Horiz.* 1994;2:131-138.
146. Jimenez-Fuentes, M.A., Gea, J., Pallas, O., Gallego, F., Felez, M.A., Broquetas, J.M. [Fiber morphometry of the external intercostal muscle. Comparison of dominant and nondominant sides in patients with severe COPD]. *Arch. Bronconeumol.* 1998;34:189-193.
147. Jobin, J., Maltais, F., Doyon, J.F., Leblanc, P., Simard, P.M., Simard, A.A., Simard, C. Chronic obstructive pulmonary disease: capillarity and fiber-type characteristics of skeletal muscle. *J Cardiopulm.Rehabil.* 1998;18:432-437.
148. Junqueira, L. C. Carneiro, J. Tejido Muscular, en: Histología básica, texto y atlas. 6a Ed. Barcelona: Masson, S.A., 2005:184-199.
149. Kanervisto, M., Paavilainen, E., Astedt-Kurki, P. Impact of chronic obstructive pulmonary disease on family functioning. *Heart Lung.* 2003;32:360-367.
150. Kelsen, S.G., Ference, M., Kapoor, S. Effects of prolonged undernutrition on structure and function of the diaphragm. *J Appl Physiol.* 1985;58:1354-1359.
151. Kelsen, S.G., Bao, S., Thomas, A.J., Mardini, I.A., Criner, G.J. Structure of parasternal intercostal muscles in the adult hamster: topographic effects. *J Appl Physiol.* 1993;75:1150-1154.
152. Killian, K.J., Leblanc, P., Martin, D.H., Summers, E., Jones, N.L., Campbell, E.J. Exercise capacity and ventilatory, circulatory, and symptom limitation in patients with chronic airflow limitation. *Am Rev Respir Dis.* 1992;146:935-940.
153. Klitgaard, H., Bergman, O., Betto, R., Salviati, G., Schiaffino, S., Clausen, T., Saltin, B. Co-existence of myosin heavy chain I and IIa isoforms in human skeletal muscle fibres with endurance training. *Pflugers Arch.* 1990a;416:470-472.
154. Klitgaard, H., Zhou, M., Schiaffino, S., Betto, R., Salviati, G., Saltin, B. Ageing alters the myosin heavy chain composition of single fibres from human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 1990b;140:55-62.
155. Kobzik, L., Reid, M.B., Bredt, D.S., Stamler, J.S. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature.* 1994;372:546-548.
156. Koechlin, C., Maltais, F., Saey, D., Michaud, A., Leblanc, P., Hayot, M., Prefaut, C. Hypoxaemia enhances peripheral muscle oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2005;60:834-841.
157. Kondo, H., Miura, M., Nakagaki, I., Sasaki, S.,

- Itokawa, Y. Trace element movement and oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am J Physiol.* 1992;262:E583-E590.
158. Krief B. Impacto social y económico de la EPOC en España. *Farmacoeconomía.* 1996;V:8-19.
159. La Medicina Maya. [revisado el 21 de septiembre de 2005]. Disponible en: <http://idd0073h.eresmas.net/maya4u.htm>
160. Laennec RTH De l'auscultation médiate, ou Traité du diagnostic des Maladies des Poumons et du Coeur. J.A. Brosson et J.S.Chaudé Eds. París, 1819.
161. Laporta, D. Grassino, A. Assessment of transdiaphragmatic pressure in humans. *J Appl Physiol.* 1985;58:1469-1476.
162. Laroche, C.M., Mier, A.K., Moxham, J., Green, M. The value of sniff esophageal pressures in the assessment of global inspiratory muscle strength. *Am Rev Respir Dis.* 1988;138:598-603.
163. Larsson, L., Li, X., Berg, H.E., Frontera, W.R. Effects of removal of weight-bearing function on contractility and myosin isoform composition in single human skeletal muscle cells. *Pflugers Arch.* 1996;432:320-328.
164. Larsson, L., Li, X., Frontera, W.R. Effects of aging on shortening velocity and myosin isoform composition in single human skeletal muscle cells. *Am J Physiol.* 1997;272:C638-C649.
165. Levine, S., Kaiser, L., Leferovich, J., Tikunov, B. Cellular adaptations in the diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. *N.Engl.J Med.* 1997;337:1799-1806.
166. Li, R.C., Maffulli, N., Hsu, Y.C., Chan, K.M. Isokinetic strength of the quadriceps and hamstrings and functional ability of anterior cruciate deficient knees in recreational athletes. *Br.J Sports Med.* 1996;30:161-164.
167. Lloreta, J., Orozco, M., Gea, J., Corominas, J.M., Serrano, S. Selective diaphragmatic mitochondrial abnormalities in a patient with marked air flow obstruction. *Ultrastruct.Pathol.* 1996;20:67-71.
168. Lopes, J., Russell, D.M., Whitwell, J., Jeejeebhoy, K.N. Skeletal muscle function in malnutrition. *Am J Clin Nutr.* 1982;36:602-610.
169. Lundgren, F., Dahllof, A.G., Schersten, T., Bylund-Fellenius, A.C. Muscle enzyme adaptation in patients with peripheral arterial insufficiency: spontaneous adaptation, effect of different treatments and consequences on walking performance. *Clin Sci (Lond).* 1989;77:485-493.
170. Macklem, P.T. Roussos, C.S. Respiratory muscle fatigue: a cause of respiratory failure? *Clin.Sci Mol.Med.* 1977;53:419-422.
171. Maltais, F., Leblanc, P., Simard, C., Jobin, J., Berube, C., Bruneau, J., Carrier, L., Belleau, R. Skeletal muscle adaptation to endurance training in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996a;154:442-447.
172. Maltais, F., Simard, A.A., Simard, C., Jobin, J., Desgagnés, P., Leblanc, P. Oxidative capacity of the skeletal muscle and lactic acid kinetics during exercise in normal subjects and in patients with COPD. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996b;153:288-293.
173. Maltais, F., Leblanc, P., Jobin, J., Berube, C., Bruneau, J., Carrier, L., Breton, M.J., Falardeau, G., Belleau, R. Intensity of training and physiologic adaptation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;155:555-561.
174. Maltais, F., Jobin, J., Sullivan, M.J., Bernard, S., Whittom, F., Killian, K.J., Desmeules, M., Belanger, M., Leblanc, P. Metabolic and hemodynamic responses of lower limb during exercise in patients with COPD. *J Appl Physiol.* 1998;84:1573-1580.
175. Maltais, F., Sullivan, M.J., Leblanc, P., Duscha, B.D., Schachat, F.H., Simard, C., Blank, J.M., Jobin, J. Altered expression of myosin heavy chain in the vastus lateralis muscle in patients with COPD. *Eur Respir J.* 1999;13:850-854.
176. Man, W.D., Luo, Y.M., Mustfa, N., Rafferty, G.F., Glerant, J.C., Polkey, M.I., Moxham, J. Postprandial effects on twitch transdiaphragmatic pressure. *Eur Respir J.* 2002;20:577-580.
177. Man, W.D., Moxham, J., Polkey, M.I. Magnetic stimulation for the measurement of respiratory and skeletal muscle function. *Eur Respir J.* 2004;24:846-860.
178. Mannino, D.M., Brown, C., Giovino, G.A. Obstructive lung disease deaths in the United States from 1979 through 1993. An analysis using multiple-cause mortality data. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156:814-818.
179. Martínez Llamas, A. Manual de patología tabáquica. El tabaco y su historia. Ministerio de Sanidad y Consumo. Dirección General de Salud Pública. Madrid., 1982:19-22.
180. Martínez Llamas, A. Patología del consumo de tabaco. El tabaco como planta fumable. Consideraciones históricas. Ed. Glosa, Barcelona, 1989:13-18.
181. Martínez-Llorens, J., Ramírez-Sarmiento, A., Coronell, C., Orozco-Levi, M., Broquetas, J., Gea, J. Intercostal extern: característiques estructurals bàsiques en subjectes joves i sans d'ambdós sexes. *Ann Med.* 2002;
182. Martínez-Llorens, J.M. Cèl·lules Satèl·lit i Miogènesi en els músculs esquelètics dels pacients amb MPOC. *Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.* 2004.

183. Martínez-Llorens, J.M., Coronell, C., Ramírez-Sarmiento, A., Orozco-Levi, M., Espadaler, J.M., Galdiz, J.B., Gea, J. Fuerza Máxima del diafragma en la EPOC: estimulación magnética cervical frente a la clásica maniobra de inhalación forzada. *Arch.Bronconeumol.* 2006. (en prensa).
184. Martyn, J.B., Moreno, R.H., Pare, P.D., Pardy, R.L. Measurement of inspiratory muscle performance with incremental threshold loading. *Am Rev Respir Dis.* 1987;135:919-923.
185. Mayos, M., Giner, J., Casan, P., Sanchis, J. Measurement of maximal static respiratory pressures at the mouth with different air leaks. *Chest.* 1991;100:364-366.
186. McArdle, W., Katch, F.I., Katch, V.L. Exercise physiology. Energy, nutrition and human performance. Lea and Febiger. Philadelphia, 1991.
187. McArdle, W., Katch, F., Katch, V. Fundamentos de fisiología del ejercicio. Segunda Edición. Ed. McGraw-Hill, 2000.
188. Menezes, A.M., Perez-Padilla, R., Jardim, J.R., Muino, A., Lopez, M.V., Valdivia, G., Montes de Oca, M., Talamo, C., Hallal, P.C., Victoria, C.G., PLATINO Team. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet.* 2005;366:1875-1881.
189. Mier, A., Brophy, C., Moxham, J., Green, M. Twitch pressures in the assessment of diaphragm weakness. *Thorax.* 1989;44:990-996.
190. Mills, G.H., Kyroussis, D., Hamnegard, C.H., Polkey, M.I., Green, M., Moxham, J. Bilateral magnetic stimulation of the phrenic nerves from an anterolateral approach. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154:1099-1105.
191. Miravittles, M., Murio, C., Guerrero, T., Gisbert, R. Costs of chronic bronchitis and COPD: a 1-year follow-up study. *Chest.* 2003;123:784-791.
192. Mittal, R.K., Rochester, D.F., McCallum, R.W. Electrical and mechanical activity in the human lower esophageal sphincter during diaphragmatic contraction. *J Clin.Invest.* 1988;81:1182-1189.
193. Montemayor, T., Alfajeme, I., Escudero, C., Morera, J., Sanchez, A.L. [Guidelines on the diagnosis and treatment of chronic obstructive lung disease. The SEPAR Working Group. The Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery]. *Arch Bronconeumol.* 1996;32:285-301.
194. Montes de Oca, M., Rassulo, J., Celli, B.R. Respiratory muscle and cardiopulmonary function during exercise in very severe COPD. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154:1284-1289.
195. Montes de Oca, M., Celli, B.R. Respiratory muscle recruitment and exercise performance in eucapnic and hypercapnic severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:880-885.
196. Montes de Oca, M., Torres, S.H., De Sanctis, J., Mata, A., Hernandez, N., Talamo, C. Skeletal muscle inflammation and nitric oxide in patients with COPD. *Eur Respir J.* 2005;26:390-397.
197. Morales, P., Sanchis, J., Cordero, P.J., Diez, J.L. [Maximum static respiratory pressures in adults. The reference values for a Mediterranean Caucasian population]. *Arch Bronconeumol.* 1997;33:213-219.
198. Moxham, J., Edwards, R.H., Aubier, M., De Troyer, A., Farkas, G., Macklem, P.T., Roussos, C. Changes in EMG power spectrum (high-to-low ratio) with force fatigue in humans. *J Appl Physiol.* 1982;53:1094-1099.
199. Mulvey, D.A., Elliott, M.W., Koulouris, N.G., Carroll, M.P., Moxham, J., Green, M. Sniff esophageal and nasopharyngeal pressures and maximal relaxation rates in patients with respiratory dysfunction. *Am Rev Respir Dis.* 1991;143:950-953.
200. Murciano, D., Aubier, M., Lecocguic, Y., Pariente, R. Effects of theophylline on diaphragmatic strength and fatigue in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *N.Engl.J Med.* 1984;311:349-353.
201. Murray, C.J. Lopez, A.D. Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science.* 1996b;274:740-743.
202. Murray, C.J.L. Lopez, A.D. The global burden of disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries and risk factors in 1990 and Projected to 2020. Cambridge, MA: Harvard University Press, 1996b.
203. National Health Service Executive Burdens of disease: a discussion document. London: Department of Health.1996.
204. National Heart Lung and Blood Institute Morbidity and Mortality: 2002 Chartbook on Cardiovascular, Lung, and Blood Diseases. Bethesda, Maryland: U.S. Department of Health and Human Services, NIH, NHLBI. May 2002. [revisado el 25 de septiembre de 2005]. Disponible en: [http://www.nhlbi.nih.gov/resources/docs/02\\_chtbk.pdf](http://www.nhlbi.nih.gov/resources/docs/02_chtbk.pdf)
205. Nickerson, B.G. Keens, T.G. Measuring ventilatory muscle endurance in humans as sustainable inspiratory pressure. *J Appl Physiol.* 1982;52:768-772.
206. Ninane, V., Rypens, F., Yernault, J.C., De Troyer, A. Abdominal muscle use during breathing in patients with chronic airflow obstruction. *Am Rev Respir Dis.* 1992;146:16-21.

207. Ninane, V. "Intrinsic" PEEP (PEEPi): role of expiratory muscles. *Eur Respir J*. 1997;10:516-518.
208. O'Byrne, P.M. Postma, D.S. The many faces of airway inflammation. Asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Asthma Research Group. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:S41-S63.
209. O'Donnell, D.E., Sani, R., Anthonisen, N.R., Younes, M. Expiratory resistive loading in patients with severe chronic air-flow limitation. An evaluation of ventilatory mechanics and compensatory responses. *Am Rev Respir Dis*. 1987;136:102-107.
210. Orozco-Levi, M., Molina, L.L., Felez, M., Gea, J., Tous, F., Broquetas, J.M. Ultrasonographic assessment of the human diaphragm contraction. *Eur Respir J*. 1995a;8:190s.
211. Orozco-Levi, M. Cambios adaptativos en la estructura subcelular del diafragma humano. Asociaciones con la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). *Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona*. 1995b.
212. Orozco-Levi, M., Gea, J., Monells, J., Aran, X., Aguar, M.C., Broquetas, J.M. Activity of latissimus dorsi muscle during inspiratory threshold loads. *Eur Respir J*. 1995c;8:441-445.
213. Orozco-Levi, M., Gea, J. Los músculos respiratorios: nuevos conceptos en anatomía, fisiología y su papel en la enfermedad pulmonar crónica. *Rev Colomb Neumol*. 1996a;18:190-206.
214. Orozco-Levi, M., Gea, J., Lloreta, J., Minguella, J., Broquetas, J.M. Changes in the capillary content of the diaphragm in COPD patients: A sort of muscle remodeling? *Am J Respir Crit Care Med*. 1996b;153:A298.
215. Orozco-Levi, M., Jimenez, M.A., Gea, J., Corominas, J.M., Broquetas, J.M. Capillary supply of the respiratory muscles in COPD. *Eur Respir J*. 1996c;9:158.
216. Orozco-Levi, M., Gea, J. [The diaphragm]. *Arch Bronconeumol*. 1997a;33:399-411.
217. Orozco-Levi, M., Gea, J., Aguar, M.C., Martin-Campos, J., Broquetas, J.M. Changes in myosin expression in the external intercostal muscles of COPD patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997b;A510.
218. Orozco-Levi, M., Gea, J., Maldonado, D. Función de los músculos respiratorios en pacientes con epoc. Expresión de una miopatía sistémica? *Arch Bronconeumol*. 1998;34:A58.
219. Orozco-Levi, M., Gea, J., Lloreta, J.L., Felez, M., Minguella, J., Serrano, S., Broquetas, J.M. Subcellular adaptation of the human diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 1999;13:371-378.
220. Orozco-Levi, M., Gea, G.J. [Muscle changes in chronic obstructive pulmonary disease: the theory of compartments]. *Arch Bronconeumol*. 2000;36:95-102.
221. Orozco-Levi, M., Gea, J., Ferrer, A., Mendez, R., Ramirez-Sarmiento, A., Maldonado, D., Broquetas, J. Expiratory muscle endurance in middle-aged healthy subjects. *Lung*. 2001a;179:93-103.
222. Orozco-Levi, M., Lloreta, J., Minguella, J., Serrano, S., Broquetas, J.M., Gea, J. Injury of the human diaphragm associated with exertion and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001b;164:1734-1739.
223. Orozco-Levi, M., Garcia-Aymerich, J., Villar, J., Ramirez-Sarmiento, A., Anto, J.M., Gea, J. Wood smoke exposure and risk for chronic obstructive pulmonary disease in Spain. *Eur Respir J*. 2006a. (en prensa).
224. Orozco-Levi, M., Lloreta, J., Gea, J. The "Oil Well Analogy" as a comprehensive interpretation of factors leading to muscle wasting. *Ultrastructural Pathology*. 2006b. (en prensa).
225. Pascual, F., Vicéns, S. Aspectos históricos, sociales y económicos del tabaco. En: Adicciones. Monografía Tabaco. Ed. E. Becoña, 2004:Vol. 16, supl. 2:13-24.
226. Pasto, M. Función respiratoria, proteínas estructurales y actividad enzimática en el diafragma. *Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona*, 1988.
227. Pastoris, O., Dossena, M., Foppa, P., Arnaboldi, R., Gorini, A., Villa, R.F., Benzi, G. Modifications by chronic intermittent hypoxia and drug treatment on skeletal muscle metabolism. *Neurochem.Res*. 1995;20:143-150.
228. Patessio, A., Casaburi, R., Carone, M., Appendini, L., Donner, C.F., Wasserman, K. Comparison of gas exchange, lactate, and lactic acidosis thresholds in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis*. 1993;148:622-626.
229. Pena, V.S., Miravittles, M., Gabriel, R., Jimenez-Ruiz, C.A., Villasante, C., Masa, J.F., Viejo, J.L., Fernandez-Fau, L. Geographic variations in prevalence and underdiagnosis of COPD: results of the IBERPOC multicentre epidemiological study. *Chest*. 2000;118:981-989.
230. Petty, T.L., Silvers, W., Stanford, R.E. Mild emphysema is associated with reduced elastic recoil and increased lung size, but not with airflow limitation. *Am Rev Respir Dis*. 1987;136:867-876.
231. Pincivero, D.M., Coelho, A.J., Campy, R.M. Perceived exertion and maximal quadriceps femoris muscle strength during dynamic knee extension exercise in young adult males and females. *Eur J Appl Physiol*. 2003;89:150-156.

232. Pla de Salut de Catalunya 2003:231-236.
233. Polkey, M.I., Duguet, A., Luo, Y., Hughes, P.D., Hart, N., Hamnegard, C.H., Green, M., Similowski, T., Moxham, J. Anterior magnetic phrenic nerve stimulation: laboratory and clinical evaluation. *Intensive Care Med.* 2000;26:1065-1075.
234. Pouw, E.M., Koerts-de Lang, E., Gosker, H.R., Freling, G., van der Vusse, G.J., Wouters, E.F., Schols, A.M. Muscle metabolic status in patients with severe COPD with and without long-term prednisolone. *Eur Respir J.* 2000;16:247-252.
235. Pride, N.B., Vermeire, P., Allegra, L. Diagnostic labels applied to model case histories of chronic airflow obstruction. Responses to a questionnaire in 11 North American and Western European countries. *Eur Respir J.* 1989;2:702-709.
236. Ramirez-Sarmiento, A., Orozco-Levi, M., Barreiro, E., Mendez, R., Ferrer, A., Broquetas, J., Gea, J. Expiratory muscle endurance in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2002a;57:132-136.
237. Ramirez-Sarmiento, A., Orozco-Levi, M., Guell, R., Barreiro, E., Hernandez, N., Mota, S., Sangenis, M., Broquetas, J.M., Casan, P., Gea, J. Inspiratory muscle training in patients with chronic obstructive pulmonary disease: structural adaptation and physiologic outcomes. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002b;166:1491-1497.
238. Ramirez-Sarmiento, A., Orozco-Levi, M., Coronell, C., Guell, R., Casan, P., Sanchis, J., Gea, J. Expiratory muscle training in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *En Revisión Eur Respir J.* 2006.
239. Ranvier, L. Propriétés et structure différentes des muscles rouges et des muscles blanc chez les lapin et chez les raies. *C.R.Acad.Sci.Paris.* 1873;77:1030-1034.
240. Rijcken, B., Schouten, J.P., Xu, X., Rosner, B., Weiss, S.T. Airway hyperresponsiveness to histamine associated with accelerated decline in FEV1. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;151:1377-1382.
241. Rochester, D.F., Arora, N.S. Respiratory muscle failure. *Med Clin North Am.* 1983;67:573-597.
242. Rochester, D.F. The diaphragm: contractile properties and fatigue. *J Clin Invest.* 1985a;75:1397-1402.
243. Rochester, D.F., Braun, N.M. Determinants of maximal inspiratory pressure in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis.* 1985b;132:42-47.
244. Rochester, D.F. Respiratory muscles: structure, size and adaptive capacity. In: reathlessness, the campbell symposium. Jones NL, Killian KJ, Eds, 1992:2-12.
245. Rohmert, W. Ermittlung von Erholung-spausen fur statische Arbeit des Menschen. *Int Z Angew Physiol.* 1960;18:123.
246. Rutten-van Molken, M.P., Postma, M.J., Joore, M.A., Van Genugten, M.L., Leidl, R., Jager, J.C. Current and future medical costs of asthma and chronic obstructive pulmonary disease in The Netherlands. *Respir Med.* 1999;93:779-787.
247. Sala, E., Roca, J., Marrades, R.M., Alonso, J., Gonzalez De Suso, J.M., Moreno, A., Barbera, J.A., Nadal, J., de Jover, L., Rodriguez-Roisin, R., Wagner, P.D. Effects of endurance training on skeletal muscle bioenergetics in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159:1726-1734.
248. Saltin, B., Gollnick, P. D. Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance. En: Handbook of Physiology: Skeletal Muscle. L. D. Peachy Ed., Bethesda, MD. American Physiological Society;1983, 1983:555-631.
249. Sanchez, J., Derenne, J.P., Debesse, B., Riquet, M., Monod, H. Typology of the respiratory muscles in normal men and in patients with moderate chronic respiratory diseases. *Bull.Eur Physiopathol.Respir.* 1982;18:901-914.
250. Sanchez, J., Medrano, G., Debesse, B., Riquet, M., Derenne, J.P. Muscle fibre types in costal and crural diaphragm in normal men and in patients with moderate chronic respiratory disease. *Bull.Eur Physiopathol.Respir.* 1985;21:351-356.
251. Satta, A., Migliori, G.B., Spanevello, A., Neri, M., Bottinelli, R., Canepari, M., Pellegrino, M.A., Reggiani, C. Fibre types in skeletal muscles of chronic obstructive pulmonary disease patients related to respiratory function and exercise tolerance. *Eur Respir J.* 1997;10:2853-2860.
252. Saulea, J., Gea, J., Orozco-Levi, M., Corominas, J., Minguella, J., Aguar, C., Broquetas, J., Agusti, A.G. Structure and function relationships of the respiratory muscles. *Eur.Respir J.* 1998;11:906-911.
253. Schols, A.M., Mostert, R., Soeters, P.B., Wouters, E.F. Body composition and exercise performance in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 1991a;46:695-699.
254. Schols, A.M., Wouters, E.F., Soeters, P.B., Westerterp, K.R. Body composition by bioelectrical-impedance analysis compared with deuterium dilution and skinfold anthropometry in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr.* 1991b;53:421-424.
255. Serisier, D.E., Mastaglia, F.L., Gibson, G.J. Respiratory muscle function and ventilatory control. I in patients with motor neurone disease. II in patients with myotonic dystrophy. *Q.J Med.* 1982;51:205-226.
256. Sifakas, N.M., Vermeire, P., Pride, N.B., Paoletti, P., Gibson, J., Howard, P., Yernault, J.C., Decramer, M.,



- Higenbottam, T., Postma, D.S., and . Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The European Respiratory Society Task Force. *Eur Respir J*. 1995;8:1398-1420.
257. Silverman, E.K., Chapman, H.A., Drazen, J.M., Weiss, S.T., Rosner, B., Campbell, E.J., O'DONNELL, W.J., Reilly, J.J., Ginns, L., Mentzer, S., Wain, J., Speizer, F.E. Genetic epidemiology of severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. Risk to relatives for airflow obstruction and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:1770-1778.
258. Simard, C., Maltais, F., Leblanc, P., Simard, P.M., Jobin, J. Mitochondrial and capillarity changes in vastus lateralis muscle of copd patients: electron microscopy study. *Med Sci Sports Exerc*. 1996;28:95.
259. Similowski, T., Fleury, B., Launois, S., Cathala, H.P., Bouche, P., Derenne, J.P. Cervical magnetic stimulation: a new painless method for bilateral phrenic nerve stimulation in conscious humans. *J Appl Physiol*. 1989;67:1311-1318.
260. Similowski, T., Yan, S., Gauthier, A.P., Macklem, P.T., Bellemare, F. Contractile properties of the human diaphragm during chronic hyperinflation. *N.Engl.J Med*. 1991;325:917-923.
261. Simpson, K., Killian, K., McCartney, N., Stubbing, D.G., Jones, N.L. Randomised controlled trial of weightlifting exercise in patients with chronic airflow limitation. *Thorax*. 1992;47:70-75.
262. Sinderby, C., Lindstrom, L., Grassino, A.E. Automatic assessment of electromyogram quality. *J Appl Physiol*. 1995;79:1803-1815.
263. Snider, G.L., Kleinerman, J., Thurlbeck, W.M., Bengali, Z.K. The definition of emphysema. Report of a National Heart, Lung, and Blood Institute, Division of Lung Diseases workshop. *Am Rev Respir Dis*. 1985;132:182-185.
264. Steele, R.H. Heard, B.E. Size of the diaphragm in chronic bronchitis. *Thorax*. 1973;28:55-60.
265. Sullivan, S.D., Ramsey, S.D., Lee, T.A. The economic burden of COPD. *Chest*. 2000;117:5S-9S.
266. Sunyer, J. Urban air pollution and chronic obstructive pulmonary disease: a review. *Eur Respir J*. 2001;17:1024-1033.
267. Supinski, G., DiMarco, A., Ketai, L., Hussein, F., Altose, M. Reversibility of diaphragm fatigue by mechanical hyperperfusion. *Am Rev Respir Dis*. 1988;138:604-609.
268. Tabin, G.C., Gregg, J.R., Bonci, T. Predictive leg strength values in immediately prepubescent and postpubescent athletes. *Am J Sports Med*. 1985;13:387-389.
269. Takabatake, N., Nakamura, H., Abe, S., Inoue, S., Hino, T., Saito, H., Yuki, H., Kato, S., Tomoike, H. 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;161:1179-1184.
270. Tangri, S. Woolf, C.R. The breathing pattern in chronic obstructive lung disease during the performance of some common daily activities. *Chest*. 1973;63:126-127.
271. Testut, L. Latarjet, A. Miología, en Anatomía Humana Tomo I. Barcelona. Salvat Editores, S.A. 9ª edición, 1969a.
272. Testut, L. Latarjet, A. Músculos de la pierna, en Anatomía Humana Tomo I. Barcelona. Salvat Editores, S.A. 9ª edición, 1969b:1149-1154.
273. Testut, L. Latarjet, A. Músculos del abdomen, en Anatomía Humana Tomo I. Barcelona. Salvat Editores, S.A. 9ª edición, 1969c:921-968.
274. Testut, L. Latarjet, A. Músculos del abdomen. Región superior o diafragmática, en Anatomía Humana Tomo I. Barcelona. Salvat Editores, S.A. 9ª edición, 1969d:983-996.
275. Testut, L. Latarjet, A. Músculos del miembro superior, en Anatomía Humana Tomo I. Barcelona. Salvat Editores, S.A. 9ª edición, 1969e:997-1012.
276. Testut, L. Latarjet, A. Músculos del muslo, en Anatomía Humana Tomo I, Salvat Editores, S.A. 9ª edición, 1969f:1110-1148.
277. Testut, L. Latarjet, A. Músculos del muslo, en Anatomía Humana Tomo I. Barcelona. Salvat Editores, S.A. 9ª edición, 1969g:1110-1148.
278. Testut, L. Latarjet, A. Músculos del tórax, en Anatomía Humana Tomo I. Barcelona. Salvat Editores, S.A. 9ª edición, 1969h:910-920.
279. The COPD Guidelines Group of the Standards of Care Committee of the BTS. BTS guidelines for the management of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 1997;52:S1-S28.
280. Thurlbeck, W.M. Diaphragm and body weight in emphysema. *Thorax*. 1978;33:483-487.
281. Tiffeneau, R., Pinelli, A. Régulation bronchique de la ventilation pulmonaire. *J Fr Med Chir Thorac*. 1948;2:221-227.
282. Trivedi, B. Danforth, W.H. Effect of pH on the Kinetics of Frog Muscle Phosphofructokinase. *J.Biol.Chem*. 1966;241:4110-4114.
283. Troosters, T., Gosselink, R., Rollier, H., Decramer, M. Change in lower limb muscle strength contributes to altered six minute walking distance in COPD. *Eur Respir J*. 1996;9:S144.

284. U.S.General Surgeon The health consequences of smoking: chronic obstructive lung disease. USDHHS. Pub. 84/50205. U.S. Department of Human Services. Washington D.C.1984.
285. Vollestad, N.K., Sejersted, O.M., Bahr, R., Woods, J.J., Bigland-Ritchie, B. Motor drive and metabolic responses during repeated submaximal contractions in humans. *J Appl Physiol.* 1988;64:1421-1427.
286. Vollestad, N.K. Measurement of human muscle fatigue. *J Neurosci.Methods.* 1997;74:219-227.
287. Westblad, P., Svedenhag, J., Rolf, C. The validity of isokinetic knee extensor endurance measurements with reference to treadmill running capacities. *Int J Sports Med.* 1996;17:134-139.
288. Whitelaw, W.A. Shape and size of the human diaphragm in vivo. *J Appl.Physiol.* 1987;62:180-186.
289. Whittom, F., Jobin, J., Simard, P.M., Leblanc, P., Simard, C., Bernard, S., Belleau, R., Maltais, F. Histochemical and morphological characteristics of the vastus lateralis muscle in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Med Sci Sports Exerc.* 1998;30:1467-1474.
290. WHO Chronic Obstruc Pulmonary Disease (COPD). [revisado el 27 de septiembre de 2005]. Disponible en: <http://www.who.int/respiratory/copd/en/>
291. Wilson, D.O., Rogers, R.M., Hoffman, R.M. Nutrition and chronic lung disease. *Am Rev Respir Dis.* 1985;132:1347-1365.
292. Wouters, E.F. Economic analysis of the Confronting COPD survey: an overview of results. *Respir Med.* 2003;97: S3-S14.
293. Wuyam, B., Payen, J.F., Levy, P., Bensaidane, H., Reutenauer, H., Le Bas, J.F., Benabid, A.L. Metabolism and aerobic capacity of skeletal muscle in chronic respiratory failure related to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 1992;5:157-162.
294. Zhou, M.Y., Klitgaard, H., Saltin, B., Roy, R.R., Edgerton, V.R., Gollnick, P.D. Myosin heavy chain isoforms of human muscle after short-term spaceflight. *J Appl. Physiol.* 1995;78:1740-1744.