



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Departamento de Fisiología

Programa de Doctorado en Fisiología

**Papel de la xantina oxidasa en la pérdida de masa
muscular por inmovilización en humanos. Importancia
del protocolo de obtención de biopsias musculares en
los estudios de atrofia muscular**

TESIS DOCTORAL presentada por:

Vicente Sebastián Alcácer

Dirigida por:

Prof. D. José Viña Ribes

Prof. Dña. Mari Carmen Gómez Cabrera

Dr. D. Enrique Viosca Herrero

En Valencia, enero de 2022

Prof. D. **José Viña Ribes**, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Prof. Dña. **Mari Carmen Gómez Cabrera**, Catedrática del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la de Valencia.

Dr. D. **Enrique Viosca Herrero**. Jefe de Servicio de Medicina Física y Rehabilitación del Hospital La Fe de Valencia

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada: **“Papel de la xantina oxidasa en la pérdida de masa muscular por inmovilización en humanos. Importancia del protocolo de obtención de biopsias musculares en los estudios de la atrofia muscular”**, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por D. **Vicente Sebastiá Alcácer**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, a 30 de enero de 2022.

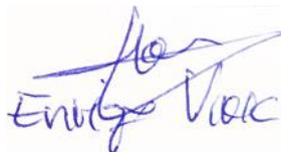
Fdo. D. J. Viña.



Fdo. Dña. M.C.
Gómez Cabrera



Fdo. D. Enrique Viosca



Durante la realización de esta tesis doctoral se han publicado los siguientes trabajos:

1. Arc-Chagnaud C, Salvador-Pascual A, Garcia-Dominguez E, Olaso-Gonzalez G, Correas AG, Serna E, Brioché T, Chopard A, Fernandez-Marcos PJ, Serrano M, Serrano AL, Muñoz-Cánoves P, **Sebastiá V**, Viña J, Gomez-Cabrera MC. Glucose 6-P dehydrogenase delays the onset of frailty by protecting against muscle damage. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2021. 12(6):1879-1896.

2. Ferrando B, Gomez-Cabrera MC, Salvador-Pascual A, Puchades C, Derbré F, Gratas-Delamarche A, Laparre L, Olaso-Gonzalez G, Cerda M, Viosca E, Alabajos A, **Sebastiá V**, Alberich-Bayarri A, García-Castro F, Viña J. Allopurinol partially prevents disuse muscle atrophy in mice and humans. *Sci Rep*. 2018 Feb 23;8(1):3549.

3. Ferrando B, Olaso-Gonzalez G, **Sebastia V**, Viosca E, Gomez-Cabrera MC, Viña J. Allopurinol and its role in the treatment of sarcopenia]. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2014. 49(6):292-8.

4. Guerra B, Gómez-Cabrera MC, Ponce-González JG, Martínez-Bello VE, Guadalupe-Grau A, Santana A, **Sebastia V**, Viña J, Calbet JA. Repeated muscle biopsies through a single skin incision do not elicit muscle signaling, but IL-6 mRNA and STAT3 phosphorylation increase in injured muscle. *J Appl Physiol* (1985). 2011;110(6):1708-15.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis directores de tesis Dr. José Viña y Dr. Enrique Viosca que me hayan dado la oportunidad de poder realizar este trabajo y la confianza que han depositado en mí desde el primer momento, siendo ambos apoyo y modelo en este arduo camino del estudio científico.

Agradezco a mi directora y tutora M. Carmen Gómez Cabrera que me ha animado a seguir con este bonito trabajo y ha estado siempre accesible y cercana para ayudarme, guiarme y apoyarme en la gestación de este proyecto. Por todo ello siempre estaré en deuda.

Agradezco a mis padres, Vicente y Lola, toda una vida de dedicación a mi crecimiento como persona, ellos me han enseñado el “buen hacer”, el sentido de la responsabilidad y la constancia en las cosas que hago. También gracias a mis suegros Joaquín, referente en el aspecto académico de mi carrera y Mar que siempre ha confiado en mí y me ha apoyado en elecciones vitales importantes. A todos ellos gracias porque me han insistido y animado en reiteradas ocasiones a realizar el esfuerzo necesario para sacar este trabajo adelante.

Agradezco especialmente a mi mujer Graciela que es el motor de mi vida, me apoya en todas y cada una de las decisiones que tomo y que me motiva constantemente para cumplir mis metas y objetivos.

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE ABREVIATURAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
ÍNDICE DE TABLAS	13
RESUMEN DE LA TESIS.....	14
1.- INTRODUCCIÓN	18
1.1. Radicales libres	18
1.2. Génesis de ERO	19
1.3. Antioxidantes.....	21
1.3.1. Antioxidantes enzimáticos.....	21
1.3.2. Antioxidantes no enzimáticos	23
1.4. Estrés oxidativo.....	25
1.4.1. Daño oxidativo a proteínas.....	26
1.4.2. Daño oxidativo a lípidos.....	27
1.4.3. Cociente GSSG/GSH.....	27
1.5. La atrofia muscular durante la inmovilización	28
1.5.1. Disminución de la masa y de la fuerza muscular durante la inmovilización y su efecto sobre el tamaño y número de fibras	28
1.5.2. Posibles mecanismos moleculares.....	32
1.6. Inmovilización y estrés oxidativo.....	36
1.6.1. Efecto de la inmovilización sobre el estrés oxidativo en el músculo esquelético.	36
1.7. Inmovilización y la vía molecular de NF-κB	41
1.7.1. Descripción de la vía de NF-κB.....	41
1.7.2. Efecto de la inmovilización sobre NF- κB	43
1.8. Relación entre NF-κB y estrés oxidativo	44
1.9. La biopsia muscular.....	46
2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	53
3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	56

3.1 ESTUDIO 1	59
3.1.1 Selección de sujetos	60
Criterios de inclusión	60
3.1.2. Calendario de los pacientes.....	62
3.1.3. Seguro	63
3.1.4. Protocolos de Imagen por Resonancia Magnética (MRI)	64
3.1.5. Análisis de imagen	65
3.1.6 Análisis estadístico	67
3.2 ESTUDIO 2	67
3.2.1. Sujetos.....	68
3.2.2. Procedimientos generales.....	69
3.2.3 Análisis estadístico	75
4 y 5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
6.- CONCLUSIONES	95
7.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
8.- ANEXOS	107

LISTA DE ABREVIATURAS

NOMENCLATURA	ABREVIATURA
Alanina aminotransferasa	ALT
Aspartato aminotransferasa	AST
Ácido desoxirribonucleico	ADN
Adenosín-5´-difosfato	ADP
4-hidroxipirazolo (3,4-d) pirimidina.	Alopurinol
Adenosín-5´-monofosfato	AMP
Análisis de la varianza	ANOVA
Creatin kinasa	CK
Área de la sección transversal	CSA
Cu/Zn Superóxido Dismutasa	Cu,ZnSOD
Enzima ubiquitina de activación	E1
Enzima ubiquitina transportadora o de conjugación	E2
Enzima Ubiquitin-ligasa	E3
Ácido etilendiaminotetraacético	EDTA
Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	ELISA
Electromiografía	EMG
Óxido nítrico sintasa endotelial	eNOS
Kinasas activadas por señales extracelulares 1 y 2	ERK1/2^{MAPK}
Especies reactivas de nitrógeno	ERN
Especies reactivas del oxígeno	ERO
Transportador de glucosa 2	GLUT2
Transportadora de glucosa 4	GLUT4
Glutación peroxidasa	GPx
Glutación reducido	GSH
Glutación oxidado	GSSG
Peroxido de hidrógeno	H₂O₂
Hipoxantina	HX
IκB kinasas	IKK

Interleuquina-1	IL-1
Interleuquina-6	IL-6
Interleuquina-8	IL-8
Óxido nítrico sintasa inducible	iNOS
Inhibidor de κ B	IκB
<i>Kinasa c-Jun</i> N-terminal	JNK
Lactato deshidrogenasa	LDH
Proteínas kinasas activadas por mitógenos	MAPK
Creatin kinasa muscular	MCK
Manganeso superóxido dismutasa	MnSOD
RNA mensajero	mRNA
Diana de la rapamicina en mamíferos	mTOR
Resonancia Magnética	MR
N-acetil-L-cisteína	NAC
Nicotinamida adenina dinucleótido	NAD⁺
Nicotinamida adenina dinucleótido	NADH
Factor Nuclear kappa B	NF-κB
Nitroninamida adenina dinucleótido fosfato	NADPH
Óxido nítrico	NO
Óxido nítrico sintasa neuronal	nNOS
Óxido nítrico sintasa	NOS
Peroxinitrito	ONOO-
Radical hidroxilo	-OH
Protein kinasa activada por mitógeno p38	p38 MAPK
Proteína C Reactiva	PCR
Proteolysis inducing factor	PIF
Radical Libre	RL
Resonancia magnética nuclear	RMN
Amplificación cuantitativa del RNA	RT-PCR
Desviación típica	SD
Dodecilsulfato sódico	SDS
Ácido tiobarbitúrico	TBA

Tesla	T
Factor de crecimiento transformante β	TGF-β
Factor de necrosis tumoral α	TNF-α
Xantina Deshidrogenasa	XDH
Xantina Oxidasa	XO
Xantina Oxidorreductasa	XOR

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Inhibición de la XOR por el alopurinol.....	25
Figura 2. Vías de producción de ERO en el músculo esquelético durante periodos de inactividad. nNOS, óxido nítrico sintasa neuronal; sintasa eNOS, óxido nítrico endotelial.....	38
Figura 3. Mecanismos de regulación de la activación de NF-κB.....	42
Figura 4. Detalles de la aguja tipo Bergström para realizar biopsias musculares.....	48
Figura 5. Protocolo de obtención de biopsias según tiempos.....	71
Figura 6. Diagrama de flujo del progreso a través de las fases del ensayo clínico aleatorizado paralelo de dos grupos	77
Figura 7. Diagrama de aleatorización y seguimiento de pacientes en ensayo clínico.....	78
Figura 8. Cuantificación del volumen y área de sección transversal del músculo sóleo por MRI en pacientes inmovilizados durante dos semanas.	83
Figura 9. Niveles de Thr202/Tyr204-ERK1/2, Thr180/Tyr182-p38 MAPK, y Thr183/Tyr185 JNK en biopsias musculares obtenidas a través de la misma	

incisión realizada cambiando el ángulo de inclinación de la
aguja de biopsia.....89

Figura 10. Niveles de fosforilación de Ser176/180-IKK α y
Ser32-IkB α en biopsias musculares obtenidas a través de
la misma incisión cambiando el ángulo de inclinación de la
aguja de la biopsia90

Figura 11. Niveles de expresión del gen IL-6 (ARNm) en
biopsias musculares obtenidas a través de la misma
incisión cambiando el ángulo de inclinación de la aguja de
la biopsia93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Selección de agentes inductores de la activación de NF- κ B.....	44
Tabla 2. Material necesario para realizar una biopsia muscular.....	57
Tabla 3. Parámetros bioquímicos en sangre. Efecto del tratamiento con alopurinol.....	81
Tabla 4. Resumen de los estudios en humanos en los que se ha tratado con ejercicio el flexor plantar o la atrofia del músculo sóleo. Comparación con los resultados obtenidos en nuestro estudio.....	85

RESUMEN DE LA TESIS

La pérdida de masa muscular producida durante la inmovilización, es un fenómeno que produce un deterioro muy significativo en la calidad de vida de las personas. La xantina oxidasa es una enzima mediadora de la degradación de las purinas que se ha postulado como una de las causantes de esta pérdida de masa muscular durante la inmovilización. El papel protector del alopurinol en la pérdida de masa muscular en distintos modelos de atrofia, a través de la inhibición de la xantina oxidasa, ha sido estudiado en animales de experimentación.

En la presente tesis doctoral nos planteamos, a través de un ensayo clínico en humanos (EUDRACT 2011-003541-17), estudiar el efecto de la administración de alopurinol en paciente inmovilizados tras un diagnóstico de esguince grado II, sobre la pérdida de masa muscular esquelética. Los pacientes fueron aleatorizados en dos grupos, aquellos que tomaron alopurinol (300 mg/día) durante un periodo de dos semanas y el grupo placebo. Transcurridas las dos semanas de inmovilización se valoró, a través de pruebas de imagen por Resonancia Magnética, el área de sección transversal, así como el volumen del músculo sóleo. Tras catorce días de inmovilización con una férula se comprobó una pérdida de masa muscular en ambos grupos experimentales. El valor de pérdida del área de

sección transversal fue del 8,6% en el grupo control frente a un 4,1% en el grupo tratado con alopurinol. Sin embargo, no encontramos prevención en la pérdida de volumen del sóleo asociada al periodo de inmovilización. Por otra parte, no encontramos diferencias significativas entre el grupo control y el de alopurinol en ningún marcador de daño inflamatorio, hepático o muscular.

Nuestros resultados muestran que el alopurinol protege parcialmente contra la atrofia muscular en humanos, tal y como se había demostrado previamente en un modelo murino. El efecto protector del alopurinol es similar al del ejercicio de resistencia, que es la forma más conocida de prevenir la pérdida de masa muscular en modelos humanos en desuso.

Para poder realizar estudios de los mecanismos implicados en el proceso de atrofia de la musculatura esquelética es imprescindible poder obtener muestras de biopsias musculares. Sin embargo, la técnica de la biopsia muscular percutánea utilizando una aguja tipo Bergtröm, de no ejecutarse con una metodología apropiada, puede interferir en las vías de señalización celular, especialmente las cascadas inflamatorias y oxidativas que se sabe están implicadas en el proceso de atrofia. En el segundo estudio de la presente tesis doctoral pretendimos valorar si la reiteración de biopsias en la misma incisión podía

favorecer procesos inflamatorios que pudiesen invalidarnos los resultados que obtenemos a la hora de analizar este tipo de muestras. Este estudio se realizó con 5 sujetos a los que se les realizaron 6 biopsias reiteradas utilizando tanto los mismos puntos de incisión como puntos diferentes. Las proteínas analizadas en las distintas muestras fueron: MAPKs: ERK1/2, p38 y JNK y la cascada de señalización celular inflamatoria de NF- κ B: I κ B, IKK α e IL-6). Se obtuvieron cuatro biopsias a través de la misma incisión (5-6 mm) de la pierna derecha (tomadas a los 0, 30, 123 y 126 minutos) y otras dos de nuevas incisiones realizadas en la pierna izquierda (a los 31 y 120 minutos). Las primeras tres biopsias de la pierna derecha se tomaron a una distancia de ~3 cm de las áreas pre-biopsiadas. La última biopsia se obtuvo del mismo punto del que se tomó la segunda biopsia. Las tres biopsias realizadas a través de la misma incisión en la piel de áreas musculares no lesionadas mostraron niveles similares de fosforilación de ERK1/2-MAPK, p38-MAPK, JNK-MAPK, IKK α , I κ B α y contenido similar de ARNm de IL-6. No hubo diferencias significativas en los niveles de fosforilación de ERK1/2-MAPK, p38-MAPK, JNK-MAPK, IKK α e I κ B α entre la media de las tres biopsias obtenidas de la misma incisión y la sexta biopsia obtenida de un área lesionada. El contenido de ARNm de IL-6 aumentó 1,8 veces en la sexta biopsia en comparación con la media de las tres biopsias obtenidas

de la misma incisión ($P < 0,05$). La conclusión de este estudio es que se pueden realizar biopsias musculares repetidas a través de una única incisión cutánea de 5 a 6 mm sin provocar señales musculares a través de cascadas que respondan al estrés celular, la inflamación o el daño muscular.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1. Radicales libres

Un radical libre (RL) es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados en su capa de valencia. Para llegar a formarse un radical libre, un compuesto puede realizarlo: perdiendo un electrón, ganándolo o mediante una unión covalente.

Los radicales libres se pueden formar en las células (Slater 1984) de distintas formas. Algunos ejemplos pueden ser: la activación de los leucocitos, reacciones enzimáticas o el transporte de electrones en cadena respiratoria.

Los radicales libres pueden ser de origen endógeno y exógeno. Cuando nos alimentamos podemos entrar en contacto con compuestos de naturaleza pro-oxidante, pero también productos como el tabaco, la polución ambiental y otros elementos puede producir radicales libres.

Los radicales libres pueden afectar a las estructuras esenciales que forman las distintas formas vitales, como puede ser el ácido desoxirribonucleico (ADN), las proteínas, los carbohidratos y también es el caso de los lípidos (Sies 1983; Halliwell 1985). De la misma forma, los radicales libres forman parte de procesos fisiopatológicos como pueden ser algunos tipos de cáncer, el caso de la diabetes (Takada 1982; Okamoto 1985), problemas

cardíacos y vasculares (Byers and Bowman 1993), enfermedades reumáticas (Wolf SP 1986), problemas gastroentéricos y patologías broncopulmonares (Slade R 1983) también puede darse en los casos de problemas neurodegenerativos como puede ser el Alzheimer (Cross, Slater et al. 1987). Pueden también estar involucrados en procesos fisiológicos como es el caso del envejecimiento (Pacifici and Davies 1991), o la afectación del músculo producida por el ejercicio físico (Davies, Quintanilha et al. 1982; Sastre, Asensi et al. 1992).

1.2. Génesis de especies reactiva de oxígeno (ERO)

Los radicales libres se producen por procesos químicos, en el interior o fuera del organismo.

Se pueden clasificar como fuentes exógenas y endógenas según el origen de su producción (Freeman and Crapo 1982).

Como el sistema hipoxantina/xantina oxidasa es prioritario en esta tesis, vamos a desarrollar con más detalle y atención este apartado.

La xantina oxidasa (XO) y la xantina deshidrogenasa (XDH) son formas interconvertibles de la misma enzima, llamada xantina oxidoreductasa (XOR) descrita en un primer momento como una aldehído oxidasa

(Schardinger, 1902). La xantina oxidorreductasa está muy distribuida en muchas especies, ya que puede aparecer en organismos sencillos como las bacterias, también en los hongos o en los insectos, y puede estar presente en los mamíferos evolucionados como es el caso del ser humano (Krenitsky et al. 1974, Parks 1986), (Ichida et al., 1993), (Glatigny and Scazzocchio 1995). En los mamíferos se encuentra en varios tejidos, como es el intestino, pulmones, cerebro, riñones y corazón. La función de la XOR, es catalizar la hidroxilación de sustratos como purinas, pirimidinas, pterinas y los aldehídos.

En los mamíferos, la enzima produce la hidroxilación de hipoxantina (HX) a xantina, y ésta deriva a ácido úrico.

La xantina oxidasa hace uso del oxígeno como aceptor de electrones mientras que la xantina deshidrogenasa, que es la forma predominante, reduce el Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD^+) (Parks and Granger 1986). La XDH puede usar tanto el NAD^+ como el oxígeno como aceptor de electrones, pero normalmente suele usar el NAD^+ . La XO, por su parte, sólo usa el oxígeno como aceptor de electrones.

La velocidad máxima de la reacción catalizada por la XDH y por la XO es prácticamente similar. Algunos autores consideran que el paso que limita la reacción es la liberación del ácido úrico de la enzima (Massey, Schopfer et al. 1989).

1.3. Antioxidantes

Durante 1995 B. Halliwell define los antioxidantes como “cualquier sustancia que, en bajas concentraciones comparada con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato” (Halliwell 1995). El organismo tiene unos mecanismos de defensa para protegerse frente a los radicales libres. Los mecanismos de defensa se clasifican en enzimáticos o no enzimáticos.

1.3.1. Antioxidantes enzimáticos

Las enzimas antioxidantes son la primera defensa contra las ERO. Pueden generarse en reacción a un estrés oxidativo, como por ejemplo en el caso de la suspensión de miembros de los roedores en los modelos que se usan para inducir de atrofia. Debido a esta característica nos son útiles para usarlos como marcadores de este estrés.

1.3.1.1. Superóxido dismutasa

Aquí se engloba a una familia de metaloproteínas muy abundantes en la naturaleza, pudiendo estar en todas las células que utilizan el oxígeno en su metabolismo (Hassan and Fridovich 1977).

Fueron McCord y Fridovich en 1969 (McCord and Fridovich 1969) quienes lo describieron. La superóxido

dismutasa (SOD) es la primera defensa contra el radical superóxido, y lo que hace es transformarlo en peróxido de hidrógeno (McCord 1974; Fridovich 1974).

En los modelos de inducción de atrofia muscular se suelen estudiar los niveles de la SOD ya que sabemos que el estrés oxidativo aumenta en el músculo esquelético en este tipo de intervenciones.

1.3.1.2. *Catalasa*

Podemos definir la catalasa como una enzima que realiza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua por un lado y en oxígeno por el otro. El peróxido de hidrógeno tiene como función la protección frente a microorganismos patógenos y en condiciones normales es un residuo del metabolismo celular de muchos organismos vivos.

La catalasa principalmente la encontramos localizada en dos organelas celulares, los peroxisomas y las mitocondrias (Halliwell & Gutteridge 1989).

1.3.1.3. *Glutación peroxidasa*

La glutación peroxidasa (GPx) transforma el peróxido de hidrógeno y los peróxidos de lípidos en moléculas no dañina. Encontramos dos tipos de glutación peroxidasa en las células, y las dos necesitan al glutación reducido como dador de equivalentes reductores (GPx selenio dependiente y GPx no selenio dependiente). La

glutación peroxidasa realiza su acción en el citosol, y en la matriz mitocondrial.

1.3.2. Antioxidantes no enzimáticos

Entre los antioxidantes no enzimáticos encontramos el alopurinol que debido a su importancia en esta tesis vamos a abordarlo en profundidad.

1.3.2.1. Alopurinol

El alopurinol es un inhibidor de la XOR, que hace posible la transformación de HX a xantina y de xantina a ácido úrico, el producto final de catabolismo de las purinas. Decimos que su función se desempeña sobre el catabolismo de las purinas sin cambiar su biosíntesis. El alopurinol ha demostrado su efectividad a la hora de producir la inhibición de la XOR *in vivo* y también *in vitro*. (Elion, Kovensky et al. 1966). El alopurinol forma un complejo reversible con el molibdeno y produce la interferencia entre las purinas y la enzima consiguiendo que éstas no puedan oxidarse (Massey, Schopfer et al. 1989). Un paso anterior a la inhibición es la metabolización del alopurinol a oxipurinol (aloxantina) para producirse posteriormente la unión de éste al sitio activo de la XOR (Massey, Schopfer et al. 1989).

Los pacientes que reciben alopurinol para el tratamiento de la gota, presentan concentraciones de HX y

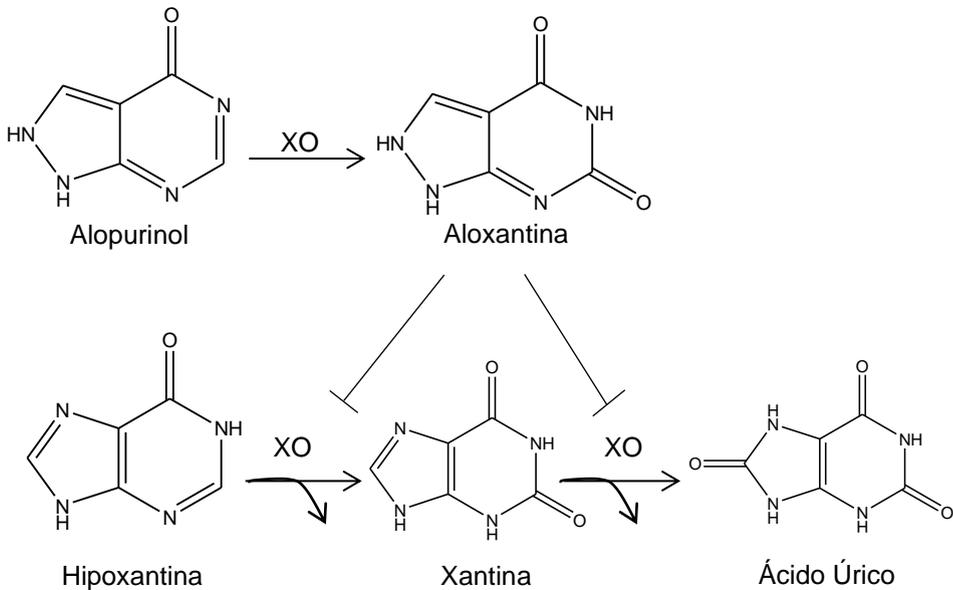
xantina a nivel sérico de 0,3-0,4 mg/dl a causa de la inhibición de la enzima, cuando los niveles normales son aproximadamente de 0.15 mg/dl. En los casos en los que los niveles de urato están por debajo de 2 mg/dl debido a altas dosis de alopurinol, se han visto niveles de purinas máximos de 0.9 mg/dl. Cuando la Hipoxantina y la xantina son eliminados por el riñón la cantidad eliminada es 10 veces más alta que la del ácido úrico.

El alopurinol se absorbe en un 90% por el tracto intestinal. La vida media es de más de 1h para el alopurinol y de 20h para el oxipurinol. Los niveles plasmáticos del alopurinol y oxipurinol tienen un pico a la hora y a las 3 horas, respectivamente. La inhibición que se produce al administrar una dosis de 300mg al día de la XO, es eficaz durante unas 24 horas (Murrell and Rapeport 1986).

El tratamiento con alopurinol puede producir entre sus reacciones adversas las erupciones en la piel, siendo su incidencia menor del 1%. Se han descrito casos de hepatotoxicidad reversible en algún caso.

El alopurinol y el oxipurinol tienen eliminación renal así que los cambios en la función renal tienen un efecto en la dosificación. En ese sentido el factor etario es relevante a la hora de prescribir el fármaco. Dado que la función renal es una de las funciones que más se modifica con el envejecimiento, la dosificación el alopurinol es un aspecto relevante

Figura 1. Inhibición de la XOR por el alopurinol.



1.4. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes con un predominio de las primeras frente a las segundas (Sies and Cadenas 1985; Sies 1986.). En el caso que los sistemas antioxidantes no puedan contener a los oxidantes y predominen las agresiones oxidativas, se da la situación de “estrés oxidativo” que puede producir lesiones celulares reversibles o irreversibles.

El estrés oxidativo se origina por un exceso de sustancias prooxidantes, un déficit de agentes antioxidantes, o por ambos factores. Cuando nos encontramos ante una situación de estrés oxidativo el organismo ha de promover mecanismos para revertir esta situación y garantizar la integridad la célula. Estos e puede conseguir con la administración de antioxidantes, con la utilización de fármacos o con la dieta (Ames 1983).

Dada la dificultad para detectar directamente los radicales libres, se puede obtener con la medición de los productos de las reacciones oxidativas (peroxidación lipídica, oxidación del ADN, oxidación de proteínas) (Halliwell 1994).

1.4.1. Daño oxidativo a proteínas

En el año 1992 Stadtman demostró en la revista Science que los aminoácidos existentes en las proteínas presentan residuos que pueden ser atacados por los radicales libres, sobre todo por el radical hidroxilo (Stadtman 1992). La tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína son los que habitualmente se oxidan (Davies, Delsignore et al. 1987). Esta oxidación da un cambio conformacional de la proteína y, esto produce una pérdida o cambio de su función biológica.

Los aminoácidos como lisina, prolina y arginina, se oxidan dando lugar a grupos carbonilo, de forma que el contenido en carbonilos de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo (Stadtman 1992). Aminoácidos como histidina, cisteína y metionina pueden oxidarse, pero en estos casos no se crean derivados de tipo carbonilo (Stadtman 1992).

1.4.2. Daño oxidativo a lípidos

Los lípidos, en concreto los ácidos grasos poliinsaturados, son los más fácilmente atacados por radicales libres (Cheeseman and Slater 1993). El ataque oxidativo a lípidos, se llama peroxidación lipídica, empieza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, se desprende un átomo de hidrógeno, y se forma un radical alquílico (Halliwell 1994). Con esto, un ataque de un radical libre forma un gran número de productos de oxidación, como malondialdehído y 4-hidroxinonenal, e hidrocarburos de cadena corta como etano y pentano (Freeman and Crapo 1982).

1.4.3. Cociente GSSG/GSH.

El cociente glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG/GSH) es uno de los indicadores más importantes

como indicador del estrés oxidativo. El incremento en la concentración de glutatión oxidado produce una alteración del estado redox celular (Sies 1986).

1.5. La atrofia muscular durante la inmovilización

1.5.1. Disminución de la masa y de la fuerza muscular durante la inmovilización y su efecto sobre el tamaño y número de fibras.

Este apartado es importante para el desarrollo de esta tesis ya que uno de nuestros estudios se va a desarrollar con pacientes inmovilizados con férula en la pierna. La atrofia muscular, como veremos puede, ser producida por diferentes mecanismos y de diferentes formas. El sedentarismo, la disminución de la actividad física, el encamamiento prolongado o la inmovilización pueden provocar una rápida atrofia de la musculatura esquelética que, a su vez, conlleva una disminución del volumen y fuerza muscular (Powers, Kavazis et al. 2005).

La caquexia es un término que describe la atrofia muscular severa y la pérdida de peso asociadas con el cáncer, el VIH o la insuficiencia orgánica terminal. La caquexia tiene una fisiopatología compleja que incluye un exceso de catabolismo, cambios endocrinos y

neurológicos. Además, el papel de la inflamación y las citoquinas tienen un papel muy relevante.

La denervación muscular, es otra de las formas donde se puede producir atrofia muscular severa.

Los vuelos espaciales, es otra situación donde vemos esta atrofia muscular. La pérdida de gravedad afecta especialmente a los músculos posturales. Algunos estudios han comprobado que, tras un vuelo espacial de 2 semanas, se produce una pérdida de 20% de la masa muscular (Williams, Kuipers et al. 2009). Cuando se realizan biopsias musculares a los astronautas después de un vuelo espacial demuestran un cambio fenotípico de las fibras tipo I a fibras tipo II (Nisoli, Clementi et al. 2003), con lo que en este tipo de musculatura se produce una mayor pérdida de fibras lentas (Buckey 2006). Además de producirse esta atrofia muscular, también se produce una pérdida de fuerza, ya que durante un vuelo espacial de seis meses de duración se objetiva una pérdida de un 50% de la fuerza explosiva (Buckey 2006).

En casos de inmobilizaciones, en personas que permanecen en cama durante mucho tiempo (periodos cercanos a un mes), se produce la pérdida de $0,4 \pm 0,1$ kg de masa muscular y del 3,5% de la fuerza, incluso en sujetos jóvenes sin patologías (Paddon Jones, Sheffield-Moore et al. 2004).

El caso de la sarcopenia senil (Rosenberg 1997), tiene una importancia notable debido a que el envejecimiento es uno de los factores que pueden producir la reducción de la fuerza y masa muscular con la edad. La calidad de vida de las personas mayores se ve muy reducida al perder masa muscular y sobre todo fuerza ya que en la vida cotidiana se requieren valores mínimos de fuerza para poder realizar acciones como sentarse en un asiento o subir y bajar escaleras.

El caso de la pérdida de masa en la sarcopenia senil es similar al del encamamiento en sujetos jóvenes y va a ser similar al modelo elegido en nuestro estudio de inmovilización con férula.

En el proceso de envejecimiento se produce una reducción de la fuerza máxima, y un descenso en la capacidad del sistema neuromuscular que es el encargado de la fuerza explosiva. Encontramos mayores pérdida de fuerza explosiva comprada con fuerza máxima cuando analizamos el mismo grupo muscular y puede ser de un 3,5% de pérdida cada año, entre los 65 y 84 años (Young and Skelton 1994).

Cuando el cuerpo envejece se produce una mayor disminución en la proporción del área ocupada por las fibras musculares de contracción rápida (% área II/I y % área fibras tipo II) en comparativa con las fibras

musculares de contracción lenta (tipo I) (Orlander, Kiessling et al. 1978).

La sarcopenia lleva consigo distintas situaciones que producen la alteración muscular asociada a la edad: la pérdida de motoneuronas, alteración hormonal, alteraciones en la ingesta calórica (proteica) (Doherty 2003).

Dado lo difícil que es realizar investigación en seres humanos para ver los mecanismos responsables de la atrofia muscular en casos de inmovilización, se han propuesto modelos con animales que pretenden imitar las condiciones de inactividad en las que se produce la atrofia muscular. El modelo de suspensión, no invasivo, de miembros posteriores de Morey-Holton y Globus (2002), produce una atrofia y pérdida de masa muscular considerable en animales jóvenes. Concretamente produce un 50% de atrofia de los músculos en los miembros posteriores de animales que se suspenden en los que predominan las fibras tipo I y entre un 15 y 20% en los músculos en los que predominan las fibras tipo II (Thomason and Booth 1990).

1.5.2. Posibles mecanismos moleculares

Como se ha comentado anteriormente la inmovilización produce una pérdida de fuerza y masa muscular pero el mecanismo que los producen está en discusión. La degradación de las proteínas es uno de los mecanismos que explican la atrofia muscular (Thomason, Biggs et al. 1989). Son varios los estudios que ratifican que en los periodos de inmovilización o suspensión la síntesis de proteínas en las fibras musculares disminuye y la degradación de la proteína aumenta.

En esta introducción comentaremos algunos de los factores relacionados con la regulación de la atrofia por inmovilización y que han sido revisados previamente por otros autores (Jackman and Kandarian 2004):

Miostatina: Es una proteína que pertenece a la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), que es un regulador negativo del crecimiento muscular. La activación de este regulador produce la pérdida de masa muscular en roedores y en humanos. Cuando tratamos células musculares cultivadas con miostatina recombinante obtenemos una reducción en el contenido proteico, y una reducción de la tasa de síntesis de proteínas (Jackman and Kandarian 2004).

Glucocorticoides: La dexametasona se utiliza para inducir la proteólisis muscular, ya sea *in vivo* o en cultivos celulares. Los glucocorticoides disminuyen la tasa de síntesis de proteínas y aumentan su degradación en el músculo esquelético. La inmovilización y la caquexia producen un incremento de los niveles circulantes de glucocorticoides, y aumentan la capacidad de unión de los corticosteroides (Jackman and Kandarian 2004).

Factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y otras citoquinas: TNF- α y otras citoquinas como la interleuquina 1 (IL-1) e interleuquina 6 (IL-6) aparecen aumentadas en los casos de atrofia muscular. Si se administra TNF- α a ratas se produce caquexia, y un bloqueo del TNF- α evita la pérdida de masa muscular. El tratamiento con TNF- α conduce a la degradación creciente de proteínas en cultivos de células musculares (Jackman and Kandarian 2004). Aparte de TNF- α , la proteína llamada PIF (Proteolysis Inducing Factor) está relacionada con la activación del factor Nuclear Kapp B (NF- κ B) el cual ha sido determinado en la presente tesis doctoral.

Hay varios sistemas proteolíticos que sabemos que pueden contribuir a la degradación de las proteínas musculares. Las proteasas lisosomales, proteasas activadas por el Ca^{2+} (calpaínas) y el sistema ubiquitin-proteasoma. Aunque las proteasas lisosomales se activan

en el músculo esquelético sometido a una atrofia por inmovilización, la importancia de estas proteasas parece limitada (Furuno and Goldberg 1986; Hasselgren, Wray et al. 2002; Purintrapiban, Wang et al. 2003). Sí parece, por otro lado, que la calpaína y el sistema ubiquitin-proteasoma producen un desajuste proteico muscular durante la atrofia muscular (Furuno and Goldberg 1986; Ikemoto, Nikawa et al. 2001; Purintrapiban, Wang et al. 2003). Tenemos también evidencia que otra proteasa, la caspasa-3, puede contribuir también en distintas formas de atrofia muscular (Du, Wang et al. 2004).

Proteólisis mediada por calpaína: Las calpaínas (calpaínas I y II) son proteasas cisteínicas dependientes de Ca^{2+} que se activan en el músculo esquelético durante periodos de inactividad (Goll, Thompson et al. 2003). Las calpaínas no producen la degradación directamente de las proteínas contráctiles, actina y miosina, pero si producen la liberación de las proteínas del sarcómero al romper las proteínas del citoesqueleto (titina, nebulina) que en su papel accesorio como componentes del sarcómero, están encargadas de sostener los elementos contráctiles. La actividad de la calpaína está regulada por varios factores, como son los niveles de calcio en el citosol y la concentración de la calpastatina inhibidora de la calpaína endógena (Goll, Thompson et al. 2003). De esta forma la actividad de la calpaína puede aumentar ante cualquier

factor que eleve las concentraciones de calcio citosólico y/o disminuya los niveles de calpastatina (Goll, Thompson et al. 2003). Se sabe que la inactividad muscular está asociada con la sobrecarga de calcio y la activación de calpaína (Kourie 1998).

La caspasa-3 y la atrofia muscular. Hay muchas vías de señalización que desencadenan la activación de un grupo único de proteasas denominado "caspasas" (Primeau, Adihetty et al. 2002). Este grupo de caspasas son endoproteasas que producen la degradación de las proteínas y, que incluso pueden causar la muerte celular programada o apoptosis.

Proteólisis mediada por proteasoma. En los modelos experimentales de animales y humanos la vía de la ubiquitin-proteasoma dependiente de ATP es la más importante en la pérdida de músculo esquelético. En estos casos las proteínas pueden ser degradadas tanto por el proteasoma nuclear 20S como por el 26S (Hasselgren, Wray et al. 2002). En la vía proteasomal 26S, la ubiquitina se une covalentemente a sustratos proteicos y los marca para su degradación.

1.6. Inmovilización y estrés oxidativo

En este punto trataremos el papel que el estrés oxidativo juega en la atrofia muscular por inactividad.

1.6.1. Efecto de la inmovilización sobre el estrés oxidativo en el músculo esquelético.

Tenemos cada vez más constancia de que el estrés oxidativo es un importante regulador de las vías que conducen a la atrofia muscular durante la inactividad muscular.

Muchos son los estudios que confirman que se produce un daño oxidativo y un deterioro muscular durante los períodos de inactividad física (Kondo, Miura et al. 1993; Kondo, Nishino et al. 1994; Lawler, Song et al. 2003) Se describen hallazgos de marcadores de daño o estrés oxidativo en muchos de los modelos descritos anteriormente: inmovilización prolongada, lesión muscular, encamamientos prolongados, vuelos espaciales, casos de denervación muscular o incluso en el envejecimiento (Servais, Letexier et al. 2007).

El tratamiento con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en células musculares produce la degradación de las proteínas, disminución de la expresión de miosina, y el aumento de la expresión de los componentes de la vía proteolítica ubiquitin-proteasoma (Jackman and Kandarian

2004). Se ha visto, por otro lado, que las EROs inducen la activación de la vía de señalización de NF- κ B, asociada a la inflamación y al catabolismo proteico (Li and Reid 2000).

Actualmente, todavía no sabemos cual es la vía más importante en la producción de radicales libres en la atrofia muscular. Pero si parece que el estrés oxidativo en el músculo esquelético inactivo pueda ser a causa de la interacción de al menos cinco vías diferentes de producción de oxidantes: 1) la generación de ERO por la vía de la XO, 2) la producción de NO a través de la sintasa de óxido nítrico (NOS), 3) la formación de ERO (radicales hidroxilo) por el aumento de los niveles celulares de hierro reactivo, 4) la Nitoninamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH) oxidasa, y 5) la producción mitocondrial de radicales superóxido (Ver figura 2).

Distintos estudios demuestran que la atrofia muscular producida en la inmovilización aumenta los niveles de peroxidación lipídica y se produce una disminución en el cociente GSH/GSSG (Kondo, Nakagani et al. 1993).

A continuación, vamos a profundizar en las fuentes oxidantes implicadas en la atrofia muscular citadas en el párrafo anterior:

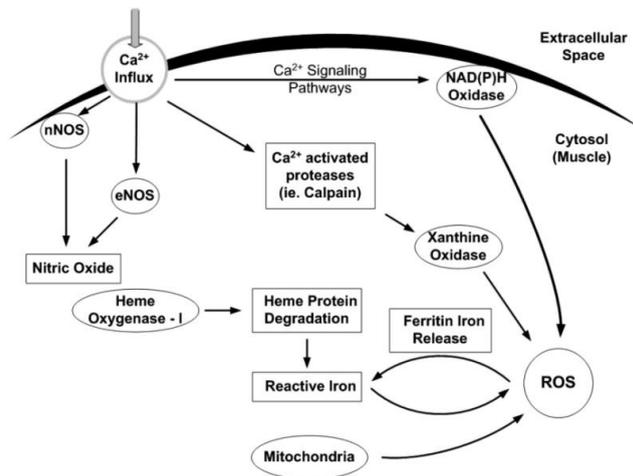
Óxido nítrico. La producción endógena de NO a través de las NOS puede dar lugar a la formación de varias

especies reactivas de nitrógeno (ERN), incluyendo el Peroxinitrito (ONOO-).

Se han descrito tres isoformas de ERN (Stamler and Meissner 2001):

- 1) La forma inducible (iNOS), que es independiente de calcio.
 - 2) La forma endotelial (eNOS), que se activa por el calcio.
 - 3) La forma neuronal (nNOS), que es también activada por el calcio.
- Ambos, nNOS y eNOS, se expresan en el músculo esquelético (Kobzik, Reid et al. 1994).

Figura 2. Vías de producción de ERO en el músculo esquelético durante periodos de inactividad.



nNOS, óxido nítrico sintasa neuronal; sintasa eNOS, óxido nítrico endotelial.

Hierro reactivo. Los metales como el hierro y el cobre pueden participar en las reacciones químicas que producen ERO (Halliwell B 1999).

Un aumento de los niveles de hierro en la célula es exponencial al daño celular oxidativo lo cual podemos comprobar al realizar la inmovilización de miembros inferiores en roedores. En estos modelos encontramos niveles altos de hierro muscular (Kondo, Miura et al. 1992a; Kondo, Miura et al. 1992b). Este aumento de hierro se asocia con la elevada peroxidación de lípidos en el músculo inmovilizado. Se ha comprobado que la administración sistémica de un quelante del hierro hace disminuir el estrés oxidativo asociado con la inmovilización del músculo (Kondo, Miura et al. 1992).

NAD(P)H-oxidasa. Tenemos constancia de que una NAD(P) H oxidasa no fagocítica y no-mitocondrial está presente en humanos y en roedores a nivel muscular. Las NAD(P)H oxidasas son unas enzimas que se encuentran en la membrana y que producen la reducción de oxígeno molecular usando NADH o NAD(P)H como donador de electrones. Muchas son las situaciones que producen un aumento de la actividad de NAD(P)H oxidasa en las células, incluyendo la vía de las protein kinasas activadas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2). Cuando el músculo está inactivo lleva consigo un aumento del calcio intracelular y con ello un aumento de la actividad del NAD(P)H oxidasa y ésto a su vez una elevada producción de radical superóxido. Aun así, no está descrito con

certeza si la inactividad del músculo esquelético supone un aumento de la NAD(P)H oxidasa ya que dicha actividad es compleja de determinar (Javesghani, Magder et al. 2002).

Producción mitocondrial de ERO. Sabemos que el transporte de electrones a lo largo de la cadena de transporte resulta en la formación de radicales superóxido. Se estima que niveles fisiológicos de oxígeno, 0.15% del total de oxígeno reducido en las mitocondrias forma radicales superóxido (StPierre, Buckingham et al. 2002). Por este motivo, la implicación de la mitocondria en la producción de radicales en el músculo a causa de la inmovilización ha sido ampliamente estudiada.

Xantina oxidasa. La XO es capaz de producir un daño oxidativo en los tejidos, ya que al aumentar su actividad se produce una cascada de reacciones en donde su fin supone aumento en las ERO (Godber B.L.J. 2000). La XO se produce en las células a través de la oxidación de sulfidrilos o de la proteólisis de XDH mediante las proteasas activadas por el calcio (calpaína) (Hellsten, Frandsen et al. 1997). Cuando hay oxígeno y sustratos purina (HX, xantina), la XO cataliza la formación de radicales superóxido y ácido úrico.

1.7. Inmovilización y la vía molecular de NF- κ B

1.7.1. Descripción de la vía de NF- κ B

NF- κ B es un factor de transcripción de respuesta al estrés cuya función principal es la de activar los llamados genes de supervivencia, que están implicados en el crecimiento celular, en los procesos de inflamación y en la apoptosis. La familia NF- κ B/Rel está formada por: c-Rel, P65, RelB, P50 y P52, los cuales forman heterodímeros siendo los más frecuentes P50/P65.

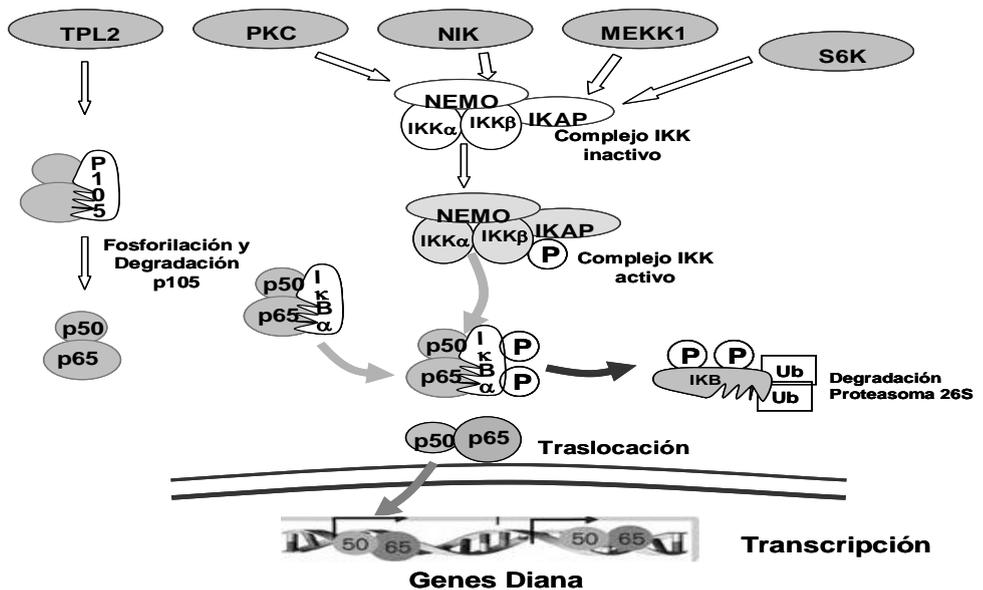
En estado de normalidad estas formas están inactivas por una proteína inhibidora a la que se encuentran unidas en el citoplasma, el inhibidor de κ B (I κ B), de las cuales hay isoformas, como I κ B α que es la más importante. Las citoquinas inflamatorias, el factor de necrosis tumoral (TNF α), las ERO y productos virales, llevan a la activación de diferentes cascadas de transducción de señales mediante múltiples vías, que producen la activación del complejo denominado I κ B quinasa (IKK), que media la fosforilación del extremo N-terminal de I κ B (Ver Figura 3).

El complejo IKK está formado por tres subunidades, IKK1 (IKK α) e IKK2 (IKK β) que tienen actividad quinasa, y la otra reguladora, conocido como el modulador esencial

de NF- κ B (NEMO/IKK γ) que no tiene actividad quinasa, pero que se necesita para formar el NF- κ B61-65.

El TNF α va a ser uno de los estímulos que producirá la activación de NF- κ B (Ver Tabla 1). La activación de NF- κ B, inhibe la señal apoptótica mediada por éste. En ausencia de NF- κ B, TNF α es capaz de activar la cascada de proteasas específicas de la apoptosis (caspasas).

Figura 3. Mecanismos de regulación de la activación de NF- κ B.



1.7.2. Efecto de la inmovilización sobre NF- κB

La atrofia muscular se produce a través de la vía ubiquitin-proteasoma (Reid and Li 2001). El factor nuclear kappa-B (NF-κB), es un factor de transcripción que regula la expresión de muchos genes, sobre todo los que producen respuestas inflamatorias agudas y respuestas al estrés (deDuve and Baudhuin 1966).

Tabla 1. Selección de agentes inductores de la activación de NF-κB.

BACTERIAS	ESTRÉS FISIOLÓGICO	MEDIADORES FISIOLÓGICOS
Helicobacter pilori	Adhesión	Bradiquina
Micobacteria	Hemorragia	Leucotrieno B4
Gardnerella vaginalis	Hiperoxia	PAF
Lactobacilli	Proteinuria	
Micobacteria tuberculosis	Reoxigenación	
	Regeneracion hepatica	
PRODUCTOS BACTERIANOS	ESTRÉS FÍSICO	PROTEINAS MODIFICADAS
Lipopolisacarido	Ejercicio	LDL oxidadas
Endotoxina estafiloquica	Radiacion Ultravioleta	Fragmento de Proteina
Lipoproteinas de membrana	Radiacion Gamma	amiloide (bA4)
PRODUCTOS VIRALES	AGENTES AMBIENTALES	RECEPTORES DE LIGANDO
ARN de doble cadena	Humo de tabaco	Antígeno (IgM-Ligand)
Adenovirus 5: E1A	Niquel	CD2-Ligand
HIV-1: Nef	Manganeso	CD3-Ligand
HIV-1: Tat	Hierro	
HBV: HBx		
CITOQUINAS INFLAMATORIAS	DROGAS DE USO TERAPEÚTICO	MEDIADORES APOPTÓTICOS
CD30 THANK		

IL-1	TNF- α	Tamoxifeno	Anti-Fas/Apo-1
IL-2	TNF- α	Aloperidol	Trail
IL-12	LIF	Bleomicina	
IL-15	IL-18	Azidotimidina (AZT)	
IL-17			

AGENTES QUÍMICOS

Etanol
 Acido linoleico
 Nicotina

MEDIADORES

FISIOLÓGICOS

Adenosine
 Albumina
 Angiotensina II
 L-Glutamato
 HSP 60
 HSP 25

HORMONAS

Insulina
 Hormona de crecimiento
 Esteroides

Cuando nos referimos a la atrofia del músculo esquelético la participación del NF- κ B ha sido muy considerada ya que se activa en respuesta a numerosas moléculas inflamatorias que causan la pérdida de la masa muscular. Reid y colaboradores demostraron, por primera vez, la activación de la vía de NF- κ B en los casos de la atrofia provocada en roedores al suspender sus miembros inferiores siendo necesario para esto la activación de IKK α (Reid and Li 2001).

1.8. Relación entre NF- κ B y estrés oxidativo

Tenemos constancia, por diferentes estudios, que el estrés oxidativo aumenta los niveles de TNF- α lo que

implica un aumento de la pérdida del contenido de proteínas musculares (Reid and Li 2001). El TNF- α activa al factor de transcripción nuclear NF- κ B, que se sabe aumenta la proteólisis en el músculo esquelético. Es, de nuevo, el grupo del Dr. Reid el que publica la propuesta de que el TNF- α activa las células musculares directamente para así estimular la pérdida de proteínas, acción realizada por NF- κ B (Reid and Li 2001).

NF- κ B aumenta la actividad de la ubiquitin-proteasoma, que produce la aceleración en la degradación regulada de proteínas musculares y está relacionado con la pérdida de la función/fuerza muscular (Reid and Li 2001). Encontramos estudios que demuestran que el estrés oxidativo es un intermediario común y crítico de diferentes señales para activar NF- κ B. Esta conclusión está basada en la inhibición de la activación de NF- κ B por una variedad de antioxidantes y por la sobreexpresión de enzimas antioxidantes. En diversos estudios se han utilizado estas enzimas para bloquear la activación de NF- κ B, aunque en muchos casos el grado de inhibición parece variar dependiendo del tipo de célula y del estímulo (Springer 2012).

1.9. La biopsia muscular

La metodología de la biopsia muscular percutánea está bien establecida y ha dado paso al desarrollo de diferentes áreas de investigación en muchas investigaciones preclínicas y clínicas. Por ejemplo, en medicina deportiva, la información obtenida de la técnica de biopsia muscular ha sido clave para ayudar a describir los procesos metabólicos en el músculo en ejercicio o destacar la influencia de los factores nutricionales en la síntesis o degradación del tejido muscular durante y después de la fuerza y ejercicio de resistencia (Ekblom 2017).

La técnica fue descrita originalmente en un artículo por Charriere y Duchenne en 1865. También se mencionó en un resumen de Bouchardat el mismo año. En ese tiempo la aguja de biopsia era de tamaño relativamente grande. El tejido extraído, como describe Bouchardat, tenía forma cuadrada, aproximadamente 1 cm de cada lado y 0,5 cm de longitud. Esta técnica carecía de la suficiente utilidad para ser aplicada en estudios humanos y no se recomendaba su uso para biopsias consecutivas de tejido muscular. La técnica no se utilizó durante casi 100 años. No fue hasta que Jonas Bergström describió una aguja en un artículo de 1962 que la técnica se reintrodujo para el muestreo de tejidos y se convirtió en una herramienta importante para la medicina en general (Ekblom 2017).

Sin embargo, las biopsias musculares se mencionaron en publicaciones anteriores. Por ejemplo, Harrison y colaboradores analizaron muestras de biopsias musculares en un artículo de 1952. En 1957, Reiffel y Stone publicaron un artículo sobre las mediciones de sodio, potasio, y fósforo en una serie de muestras de tejido muscular tomadas con la aguja de biopsia de Bickel (Ekblom 2017). Sin embargo, la falta de información en estos trabajos en relación a los detalles experimentales durante la realización de las biopsias ha supuesto que la mayoría de los investigadores consideren justo acreditar a Bergström la reintroducción de la metodología de la biopsia muscular por su descripción de la aguja, la descripción del método, y algunas aplicaciones clínicas de la biopsia muscular.

El desarrollo continuó, y en 1979, Henriksson describió con detalle el uso y algunos resultados de otro tipo de instrumento para uso preclínico y clínico el Conchotome de Well-Blakesley. Fue desarrollado originalmente por Radner y era del tipo pinzas de cocodrilo. Antes y después de la publicación de Henriksson, otros tipos de agujas y métodos fueron utilizados (Ekblom 2017).

La aguja Bergström original consta de dos cilindros (Bergström 1975). El exterior tiene 3-5 mm de diámetro con una ventana cerca de la punta (Figura 4). Cuando la aguja

exterior penetra en el músculo, el tejido muscular circundante sobresale hacia la ventana. Empujando por la aguja interior más pequeña a través de la exterior, la aguja interior afilada corta el tejido que sobresale a través de la ventana. El tejido muscular cortado permanece en la aguja interior y luego es expulsado con una vara mental. Se pueden extraer fácilmente hasta 80 mg de tejido muscular. Se puede agregar succión a las agujas de Bergström y, al hacerlo, más tejido muscular puede sobresalir a través de la ventana y ser extraído.

Figura 4. Detalles de la aguja tipo Bergström para realizar biopsias musculares.



La introducción de la aguja de Bergström supuso una eclosión de experimentos en fisiología muscular. Para

estimar cambios en las concentraciones de electrolitos, concentraciones de carbohidratos o grasas antes y, tras protocolos de contracción muscular, previo a la incorporación de esta técnica sólo se podía hacer a través de métodos como la determinación de cociente respiratorio en el aire espirado o el análisis de la diferencia arteriovenosa de distintos metabolitos con determinaciones in situ del flujo muscular. Sin embargo, estos cálculos son indirectos y solo pueden ser utilizadas para estimaciones de cuerpo entero y no de forma específica en tejido muscular. Jonas Bergström y Eric Hultman fueron los primeros en publicar datos sobre el metabolismo muscular utilizando su técnica y su aguja de biopsia. Mostraron, en una serie de experimentos, cómo se reducía la concentración de glucógeno muscular con el ejercicio y cómo a través de intervenciones nutricionales se podían restablecer sus niveles (Ekblom 2017).

Es importante señalar que la maniobra para la realización de biopsias no está exenta de cierta invasividad (La Tabla 2, en el apartado de métodos, recoge el material necesario para la realización de una biopsia con seguridad). Se requieren condiciones estériles, una anestesia local sin epinefrina (la epinefrina puede interferir con mediciones metabólicas) a nivel de la piel y de la fascia muscular superficial. La incisión a través de la piel y la

fascia debe ser lo más pequeña posible para reducir las cicatrices y los potenciales problemas de infección. Éstos, los problemas de infección son muy poco habituales y deben ser tratados de acuerdo con los procedimientos clínicos normales.

Con el fin de reducir el riesgo de sangrado tras la biopsia, se recomienda a los participantes que eviten el uso de aspirinas u otros agentes anticoagulantes antes y después de la biopsia.

Normalmente, después de una biopsia, los participantes experimentan un día o dos días de rigidez y dolor leve sin más problemas.

No está contraindicada la realización de ejercicio tras una biopsia muscular. De hecho, se han obtenido muestras de músculo vasto lateral, gastrocnemio y sóleo antes de pruebas de larga distancia como maratón sin que se hayan manifestado quejas de que el procedimiento haya interferido sobre el rendimiento de los deportistas o causado anomalías tales como dolor. Sin embargo, la herida debe ser mantenida seca el mayor tiempo posible para lo que se deben aplicar tantos vendajes como sea necesario.

En algunos casos excepcionales, se cortan pequeños nervios locales de la piel en la incisión lo que puede causar una falta de sensibilidad en el parte de la piel que inerva el nervio. Después de unos meses, la sensibilidad de la piel

vuelve a la normalidad. El riesgo de infección es muy bajo y ésta, de producirse, debe ser tratada de acuerdo a los procedimientos clínicos normales.

Una biopsia muscular puede tener algunas consecuencias menores. En cuanto a la estructura celular del área biopsiada se ha visto que las muestras tomadas algunos meses o años después de una anterior, muestran un resultado histológico de cierta atrofia muscular e incluso una tendencia a la aparición de fibras musculares del mismo tipo. Esto puede ser consecuencia de la reinervación y el reemplazo de tejido muscular en el área de biopsia. Este hecho carece de importancia práctica a menos que se tomen nuevas biopsias de forma repetida y en el mismo lugar para análisis histoquímicos y/o bioquímicos. El efecto adverso más importante de las biopsias musculares es que la penetración en el músculo puede provocar una inflamación a nivel local. Por ese motivo la recomendación general a la hora de obtener varias biopsias de un mismo músculo es la de mantener una distancia mínima de 2 cm entre las mismas con el fin de evitar la influencia inflamatoria de una biopsia previa. Esto tradicionalmente ha obligado a los investigadores a hacer una nueva incisión por cada biopsia recogida en un mismo sujeto.

Tal y como se establece en el apartado de objetivos, en nuestro segundo estudio, en la presente tesis doctoral, nos planteamos la validación de un nuevo protocolo de obtención de biopsias musculares repetidas a través de una incisión pequeña (5-6 mm) y única. Nuestra intención con este protocolo ha sido la de reducir la invasividad del método garantizando, a su vez, la objetividad de las determinaciones moleculares realizadas en las distintas muestras recogidas.

2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las hipótesis en las que se basa este trabajo son las siguientes:

1. El alopurinol es un fármaco inhibidor de la enzima xantina óxidoreductasa cuya activación se ha postulado como un factor relevante en la degradación proteica y en la atrofia muscular en pacientes inmovilizados. Es por ello que pensamos que administrando alopurinol a nuestros pacientes seremos capaces de disminuir esta atrofia muscular.
2. La biopsia muscular es un instrumento útil para el estudio fisiológico de la masa muscular en procesos de atrofia muscular incluso aunque se obtenga de manera repetida sobre la misma incisión.

En la presente tesis nos planteamos dos objetivos generales:

1. Estudiar el papel del alopurinol, un fármaco inhibidor de la enzima xantina óxidoreductasa, en la prevención de la pérdida de masa muscular por inmovilización en pacientes jóvenes con esguince de tobillo grado II y en sujetos sanos incorporados en un ensayo clínico de intervención, randomizado,

prospectivo doble ciego, con referencia EUDRACT 2011-003541-17.

Los objetivos concretos en relación con este objetivo general son:

- 1.1. Determinar el efecto del tratamiento con alopurinol sobre el área de sección transversal del músculo sóleo en sujetos a los que se inmoviliza de forma unilateral el miembro inferior durante 14 días.
- 1.2. Determinar el efecto del tratamiento con alopurinol sobre el volumen del músculo sóleo en sujetos inmovilizados durante 14 días.
- 1.3. Determinar el efecto del tratamiento con alopurinol sobre la inflamación, el daño muscular y hepático y distintos parámetros bioquímicos sanguíneos (entre los que se incluyen el ácido úrico) en sujetos inmovilizados durante 14 días.
2. Establecer un protocolo óptimo de obtención de biopsias musculares humanas con potencial traslacional en los estudios de atrofia muscular que reduzcan su invasividad y no induzcan artefactos experimentales.

Los objetivos concretos en relación a este objetivo general son:

- 2.1. Determinar la activación de cascadas de señalización celular pro-inflamatorias (NF- κ B, I κ B,

IKK α e IL-6) en 6 biopsias musculares consecutivas (4 realizadas en pierna derecha y 2 realizadas en pierna izquierda) en 5 sujetos sanos, utilizando para su obtención la misma incisión.

2.2. Determinar la activación de la expresión de la vía de las protein kinasas activadas por mitógenos (MAPKs: ERK1/2, p38 y JNK) en 6 biopsias consecutivas en sujetos sanos utilizando para su obtención la misma incisión.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, se incluye una relación de equipamiento del que se dispuso para el desarrollo de la tesis doctoral. Este equipamiento era perteneciente a las tres entidades implicadas en el desarrollo de la presente tesis doctoral: Hospital la Fe de Valencia, Universidad de Valencia y Universidad de las Palmas de Gran Canaria.

- Termociclador para RT-PCR cuantitativa en tiempo real
- Cámara fría.
- Aparatos de uso general: Balanzas de precisión, phmetro, centrifugas refrigeradas, baños termostatzados, homogenizadores, etc.
- Neveras y congeladores de -20°C, -80°C y -120°C
- Nitrógeno líquido
- Laboratorio para determinaciones de metabolitos y cinéticas enzimáticas
- Espectrofotómetro UVIKON 810 de KONTRON.
- Fuentes de alimentación y cubetas para realizar electroforesis.
- Agujas de biopsia tipo Bergström (Ver detalles sobre el material utilizado durante la biopsia en la Tabla)
- Respirador de urgencia "Ambur"
- Camillas
- Material de uso general del laboratorio: bistorí, pipetas, placas Petri, reactivos, tampones, guantes etc.

Tabla 2. Material necesario para realizar una biopsia muscular.

Nº	MATERIAL
01	AGUJAS DE BIOPSIA MUSCULAR Ø 5.0 mm
02	STERI-STRIP: Suturas cutáneas estériles 6 mm x 100 mm (1/4 in x 4 in). Caja de 50 uds. (Ref. R1546). (Marca: 3M Health Care).
03	TEGADERM + PAD: Apósito estéril transparente con cojín antiadherente 5 cm x 7 cm (2 in x 2 ¾ in). Caja de 50 uds.(Ref. 3582). (Marca: 3M Health Care)
04	HOJAS DE BISTURÍ ESTÉRILES Nº 11. Caja de 100 uds. (Marca: KIATO). (Ref. ISO 7740)
05	LIDOCAÍNA INYECTABLE BRAUN 2%. 1 x 10 ml. (Ref. 650929.6) (Marca: B. Braun Medical). 12 AMPOLLAS DE 10 ML (sobrarán 4 o 5, pero es mejor tener en exceso)
06	MEPIVACAÍNA INYECTABLE. 1x10 ml (Scandinibsa 20 mg/ml Solución Inyectable) (Ref. 821744.1)
07	SUERO FISIOLÓGICO (ISOTÓNICO) 100 ml, vía intravenosa. (Marca: ERN, Vitulia o similar)
08	HEPARINA INYECTABLE 5% (5000 U.I./ 1ml) (1 Vial de 5 ml). Vía intravenosa. (Marca: Mayne). (Ref. 768218.9)
09	AGUJA DE INYECCIÓN ESTÉRILES Ø 0,40 x 40 mm (27 G x 1 ½ “), Gr. 30/42. Caja de 100 uds. Color Gris. (Marca: B. Braun, Sterican). (Ref. 9186182)
10	AGUJA DE INYECCIÓN ESTÉRILES 0,6 mm x 25 mm (23G x 1”). Caja de 100 uds. Color azul. BD Microlance 3. (Ref. 300800)
11	AGUJA DE INYECCIÓN ESTÉRILES 0,9 mm x 25 mm (20G x 1”). Caja de 100 uds. Color amarillo. BD Microlance 3. (Ref. 304827)

12	APÓSITO PARA LA FIJACIÓN DE CATÉTERES I.V. "Cosmopor I.V.", (Marca: Hartmann) 20 UNIDADES
13	CATÉTER I.V. 20 GA 1.1 x 32 mm, 61 ml/min. BD Adsyte Pro. (Ref. 388715). (Caja de 50 uds). Color rosa. 12 UNIDADES.
14	CATÉTER I.V. 22 GA 0.9 x 25 mm, 36 ml/min. BD Adsyte Pro. (Ref. 388714). (Caja de 50 uds). 12 UNIDADES 12 UNIDADES.
15	ESPARADRAPO hipoalergénico de tejido no tejido. (Marca: Farmaban) (Ref. 1436) (Caja de 12 uds) 1 caja de 12 unidades
16	VENDAS ELÁSTICAS 4.5 m x 5 cm. (Marcas: Surgifix o Hartmann) (QUE NO SEAN ADHESIVAS). 50 unidades
17	APÓSITO PLÁSTICO AEROSOL (Marca: Inibsa, Nobecutan o Galeno). Contenido neto: 196g (250 ml). (Ref. 2000033602)
18	CLORHEXIDINA (Gluconato de clorhexidina al 2% en alcohol isopropílico al 70%)
19	ALCOHOL ETÍLICO DE 70°
20	CUCHILLAS PARA RASURAR. 2 bolsas de 12 uds. (Marca: BIC)
21	SOLUCIÓN CONCENTRADA AL 5% DE CLORHEXIDINA. (Marca: Hibimax) (Ref. 768929) desinfección de las agujas de biopsia y piel
22	CEPILLOS/ESPONJA QUIRÚRGICOS "EZ-SCRUB" "BD"

EN CASOS DE "URGENCIA"	
Nº	MATERIAL
01	DESFIBRILADOR CARDÍACO
02	RESPIRADOR DE URGENCIA "AMBUR"
03	BOTELLA DE OXÍGENO MEDICINAL, CON MASCARILLA DE OXÍGENO
04	TENSIÓMETRO AUTOMÁTICO O MANUAL
05	ESTESTOCOPIO
06	FÁRMACOS DE URGENCIA

	<ul style="list-style-type: none">• Adrenalina (laboratorios ERN) jeringa precargada de 1 ml ADRENALINA LEVEL• Atropina
--	--

Para el desarrollo de los dos objetivos generales expuestos se diseñaron dos estudios.

3.1. ESTUDIO 1

El primer estudio consistió en un ensayo clínico de intervención, randomizado, prospectivo, doble ciego y con referencia EUDRACT 2011-003541-17.

Las variables principales del estudio obtenidas fueron el área de sección transversal del músculo sóleo, así como el volumen del mismo. Establecimos la pérdida de masa muscular expresando estas dos variables como porcentaje y teniendo como referencia el propio sujeto en el momento de la actuación y catorce días tras la actuación, pudiendo contar también con el miembro contralateral del sujeto como medida control.

Por otro lado, se analizaron variables secundarias en sangre entre las que se incluyeron: parámetros de bioquímica básica (serie roja y blanca, plaquetas, glucosa, colesterol, triglicéridos) función renal (urea y creatinina), inflamatorios (PCR), de daño hepático (AST y ALT) y de daño muscular (LDH y CK) en los sujetos antes y tras la inmovilización.

Se realizó una aleatorización estableciendo una tabla excel y protocolizando la base de datos para seleccionar, al azar, el grupo al que se incorporó el sujeto. La duración del estudio fue de 3 años, el tiempo necesario para la recogida de los pacientes según el tamaño muestral obtenidos estadísticamente.

Se administró el tratamiento durante el periodo de inmovilización de 14 días y se dejó de administrar la medicación una vez transcurrido ese tiempo. Se realizó una analítica de control a los 7 días de tratamiento para objetivar que no había efectos indeseados del fármaco y poder comprobar si se estaba modificando el valor del ácido úrico. Se realizó un seguimiento de 1 mes posterior al finalizar el tratamiento para información de posibles efectos adversos y dudas de los pacientes de estudio.

El fármaco utilizado fue el alopurinol a dosis de 300 mg /24 horas administrado en comprimidos vía oral. Esta medicación se entregó al paciente en el momento de su aceptación para participar en el ensayo clínico. Se administró un frasco con 15 comprimidos al grupo de tratamiento. El grupo control no recibió tratamiento alguno.

3.1.1 Selección de sujetos

Criterios de inclusión

- Pacientes con esguince de grado II.
- Varones.

- Edad de 20 a 40 años.
- Paciente que no tomen medicación habitual.
- Todos los pacientes deben presentar por escrito el consentimiento informado completo específico para este estudio.

Criterios de exclusión

- Enfermedad hepática y gastrointestinal.
- Hipotiroidismo no tratado.
- Alcoholismo y/o drogadicción.
- Suplementos vitamínicos.
- Trastornos alimenticios.
- Fármacos que disminuyen la concentración de lípidos.
- Fármacos hipotensores.
- Fumadores.
- Deportistas que realizan ejercicio intenso.
- Trastornos mentales, depresión o ansiedad de gran intensidad. Estas enfermedades hacen al paciente incapaz de comprender la naturaleza o el ámbito y las posibles consecuencias del estudio.
- Pacientes que presenten algún proceso infeccioso y/o inflamatorio antes de la recogida de la muestra.

- Pacientes que probablemente no seguirán el protocolo debido a su falta de cooperación, a su incapacidad para volver a las visitas posteriores y a la poca posibilidad que existe de que completen los procedimientos del estudio.

3.1.2. Calendario de los pacientes

DIA 1

- Sujeto entra por puertas de urgencia con el diagnóstico de esguince de tobillo grado II que requiere inmovilización con férula durante 15 días.
- Si el sujeto cumple los criterios de inclusión es invitado a formar parte del estudio y se le entrega la información por escrito junto con el consentimiento informado.
- Una vez aceptado se le incluye en la aleatorización.
- Se le extrae una muestra sanguínea que es analizada en el Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia.
- Se le realiza una RM de ambas piernas en el mismo día o al día siguiente (según disponibilidad de RM).
- Se le da la medicación para los 15 días en su domicilio.
- Se cita al paciente a los 7 días para realizar una analítica de control para detección de posibles efectos adversos.

DIA 7

- Se realiza una analítica de control para constatación de la ausencia de efectos adversos por el fármaco dado.
- Se vuelve a dar una cita para ser valorado en 8 días.

DIA 15

- Se procede a retirar la férula y se realizará una valoración médica para el buen tratamiento de su lesión.
- Se realizará una nueva extracción de sangre que se volverá a analizar en la Universidad de Valencia.
- Se le realizará una nueva RM de ambas piernas.
- Se retira la medicación y si es necesario se le pauta nuevo tratamiento para la recuperación de su lesión.
- Si hubiera algún efecto adverso se volvería a citar hasta finalizar el proceso, de no ser así finalizaría el contacto con el paciente.

3.1.3. Seguro

El promotor contrató una póliza de seguro de responsabilidad civil para todos los pacientes que dieron su consentimiento para el estudio clínico. Esta cobertura está diseñada para el caso de que se produzca un

fallecimiento, lesión física o daño para la salud, durante la ejecución del estudio clínico.

Este trabajo fue financiado por:

1-Fundación Grupo ERESA para el Desarrollo y la Investigación Médica, AICO/2016/076from

2-Conselleria de Educación, Investigación, Cultura y Deporte, SAF2013-44663-R from the Spanish Ministry of Education and Science (MEC).

3-El pago de los seguros se llegó a un acuerdo entre el INCLIVA y el Hospital la Fe para costear a medias los mismos.

3.1.4. Protocolos de Imagen por Resonancia Magnética (MRI)

Todos los escáneres fueron adquiridos en dos equipos: General Electric de 1,5 Tesla (T) Resonancia magnética (MR) (Signa HDxt y Optima MR360, General Electric, Milwaukee, USA) usando una bobina de cuerpo completo. Ambas piernas se visualizaron simultáneamente.

La secuencia de resonancia magnética elegida para la segmentación del músculo sóleo fue un eco de gradiente ultra rápido (FSPGR). Los parámetros de adquisición fueron los siguientes: TR / TE = 9/3 ms, matriz 512 x 512, FA=10°, Espaciado de píxeles=0,6641-0,8203 mm, Grosor de corte = 5 mm, Espaciado entre cortes = 2,5-5 mm. Las imágenes fueron adquiridas en la planificación axial,

cubriendo desde la tuberosidad tibial hasta la punta inferior del maléolo lateral (utilizadas como hitos de referencia para garantizar la homogeneidad de la cobertura a través de las exploraciones).

3.1.5. Análisis de imagen

El análisis de imagen y la segmentación del músculo sóleo se realizó con Mimics Research v17.0 (Materialize, Leuven, Bélgica), bajo la supervisión de un radiólogo con más de 10 años de experiencia. Se aplicó un proceso de segmentación en 3 etapas a la secuencia de resonancia magnética de FSPGR. En primer lugar, se aplicó un umbral de nivel de gris a las imágenes para eliminar elementos de fondo y otros tejidos, tales como hueso o vasos. Un algoritmo de crecimiento de la región basado en el crecimiento de la semilla se utilizó entonces para obtener una máscara de los músculos de la pierna en estudio. El paso final consistió en un refinamiento manual de la mascarilla, removiendo otros músculos, como el gastrocnemio, y obteniendo la segmentación final.

El análisis de imagen se realizó entonces sobre la máscara resultante del músculo sóleo. Se extrajeron los siguientes biomarcadores de imagen:

- * Volumen mililitro [mL]

- * Intensidad media del nivel de gris en todo el volumen

- * Intensidad media del nivel de gris (normalizado) en todo el volumen
- * Desviación estándar de la intensidad del nivel de gris en todo el volumen
- * Intensidad máxima del nivel de gris en todo el volumen
- * Intensidad mínima del nivel de gris en todo el volumen
- * Área máxima de la sección transversal [cm²]
- * Intensidad media del nivel de gris en el área de la sección transversal
- * Desviación estándar de la intensidad del nivel de gris en el área de la sección transversal
- * Intensidad máxima del nivel de gris en el área de la sección transversal
- * Intensidad mínima del nivel de gris en el área de la sección transversal

Como medida adicional, se colocó una región 2D de interés sobre el músculo gastrocnemio en cada estudio para calcular la intensidad media del nivel de gris y la desviación estándar para propósitos de normalización.

Mediciones de laboratorio en el ensayo clínico:

La sangre se recogió por punción venosa de la vena antecubital antes y después del protocolo de inmovilización. El suero y el plasma se almacenaron a -80°C. El análisis de sangre se realizó de acuerdo con los protocolos de laboratorio estándar en el hospital central del laboratorio.

3.1.6 Análisis estadístico

Todos los resultados se muestran como valores de la media \pm desviación estándar, indicando el número de observaciones entre paréntesis.

El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos, cuando se comparan grupos controles con grupos tratados con alopurinol, se ha realizado mediante el test de la "t" de Student. El valor de la probabilidad "p" de que las diferencias entre las medidas de dos conjuntos de valores sea estadísticamente significativa se aceptó que fuese inferior a 0,05 ó 0,01, es decir que existe una probabilidad del 95% o una probabilidad del 99%, respectivamente, de que los grupos comparados sean diferentes. Todo el tratamiento estadístico de los resultados se realizó con el software: Kaleida Graph versión 3.6.

3.2 ESTUDIO 2

En el segundo estudio nos planteamos establecer un protocolo óptimo de obtención de biopsias musculares humanas con potencial traslacional en los estudios de atrofia muscular para reducir su invasividad y no inducir artefactos experimentales.

El cóctel de inhibidor de proteasa completo y el cóctel de inhibidor de fosfatasa PhosSTOP se obtuvieron de Roche

Diagnostics (Mannheim, Alemania). Todos los anticuerpos primarios anticuerpos utilizados fueron de Cell Signalling Technology (Danvers, MA, EE.UU.) a excepción del anticuerpo policlonal de conejo anti-JNK1 anticuerpo que se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE.UU.) y el ratón anti- α monoclonal -tubulina que se obtuvo de Sigma (Sigma, Madrid, España). Los anticuerpos secundarios anti-ratón de cabra anti-conejo conjugados con HRP y de ratón fueron de Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, EE.UU.). Las membranas de PVDF Immuno-Blot, el kit Immun-Star Western, el sistema ChemiDoc XRS y el software de análisis de imágenes Quantity One © se obtuvieron de Bio-Rad Laboratories (Hemel Hempstead Hertfordshire, RU).

3.2.1. Sujetos

Cinco sujetos masculinos sanos participaron en esta investigación. Todos eran no fumadores y libres de cualquier enfermedad conocida. Ninguno de ellos se había sometido a otro estudio previamente ni había sido sometido a extracción de biopsia muscular. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada sujeto después de recibir una explicación completa sobre la naturaleza y los posibles riesgos asociados con los procedimientos del estudio. El estudio fue aprobado por el

comité de ética de la Universidad de Valencia y los experimentos se ajustaron a la declaración de Helsinki.

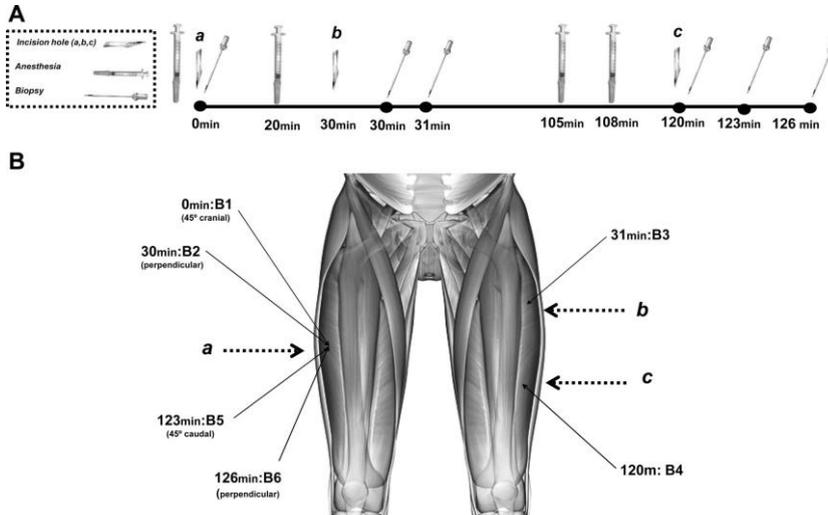
3.2.2. Procedimientos generales

Se obtuvieron seis biopsias musculares en cada sujeto utilizando la técnica de Bergström con aspiración de la porción lateral del músculo vasto lateral con los sitios de biopsia situados entre 15 y 25 cm de la apófisis media (Figura 5). Para este propósito se anestesió la piel por encima de la fascia muscular de la pierna derecha con 2-3 ml de lidocaína al 2% administrada con una aguja 27G. Luego se realizó una incisión de 5-6 mm con un bisturí triangular. Inmediatamente después de la incisión, se obtuvo la primera biopsia muscular con una aguja de biopsia tipo Bergström de 5 mm de diámetro, que se introdujo dentro del vientre muscular con una inclinación de 45° en la dirección craneal hasta que la ventana de biopsia se colocó a unos 2-3 cm por debajo de la fascia (Biopsia 1). Veinte minutos más tarde se anestesió la misma zona en la pierna izquierda (pierna contralateral), y se inyectó anestesia adicional alrededor de la piel de la primera incisión (pierna derecha). A los 30 minutos se realizó un corte de 5-6 mm en la pierna izquierda. Luego, se obtuvo la segunda biopsia de la pierna derecha introduciendo la aguja de biopsia perpendicular al vientre del músculo (sin

inclinación) (biopsia 2). Inmediatamente después, se obtuvo la primera biopsia de la pierna izquierda (ésta fue la biopsia número 3, que se obtuvo casi al mismo tiempo que la biopsia número 2, pero a partir de una nueva incisión y pierna diferente). A los 105 minutos, la piel alrededor de la incisión en la pierna derecha se anestesió de nuevo. A los 108 min, una nueva región de la pierna izquierda, 3 cm más caudal, se infiltró con anestesia. A los 120 minutos se obtuvo la cuarta biopsia de la recién realizada nueva incisión en la pierna derecha. Inmediatamente después (a los 123 minutos), la biopsia 5 se realizó introduciendo la aguja de biopsia a través de la única incisión realizada en la pierna izquierda con la aguja orientada a 45° en dirección caudal. La biopsia número 6 se obtuvo tres minutos después de la biopsia número 5 utilizando la única incisión realizada en la pierna derecha dirigiendo la aguja a la misma posición a partir de la cual se obtuvo la biopsia número 2.

En todos los casos se disecó rápidamente el tejido muscular quedando sin grasa visible y tejido conectivo, se sumergió en nitrógeno líquido y almacenado a -80 °C.

Figura 5. Protocolo de obtención de biopsias a distintos tiempos.



Se extrajeron seis biopsias a diferentes tiempos. 0 min: Anestesia local con incisión (a) y primera biopsia en la pierna derecha [biopsia 1 (B1)]. 20 min: Anestesia local en la pierna izquierda. 30 min: Incisión (b) en la pierna izquierda. 30 min: Segunda biopsia en la pierna derecha por la misma incisión, introduciendo la aguja de biopsia perpendicular al vientre muscular (B2). 31 min: Tercera biopsia (1ª biopsia en pierna izquierda; B3). 105 min: Anestesia local en la pierna izquierda (en otra parte del músculo). 108 min: Anestesia local en la pierna derecha (misma incisión). 120 min: Incisión en otra parte de la pierna izquierda (c) y cuarta biopsia (2ª en la pierna izquierda; B4). 123 min: Quinta biopsia (3ª en pierna derecha sobre la misma incisión modificando la inclinación de la aguja; B5). 126 min: Sexta biopsia (4ª en pierna derecha) en la misma incisión y con la misma inclinación que B2 para tomar muestra del mismo punto de donde se obtuvo B2 (B6)

Extracción total de proteínas, electroforesis y análisis de Western blotting.

Se prepararon extractos de proteínas musculares como se describió en trabajos previos de nuestro grupo de investigación (Guerra et al 2007). Se cuantificó el contenido de proteína total utilizando el método de Bradford (Pilegaard et al 2006). Se sometieron cantidades iguales (50 µg) de cada muestra al protocolo de electroforesis e inmunotransferencia.

La electroforesis es un transporte bajo la acción de un campo eléctrico. Utilizando esta técnica estudiamos los niveles proteicos de: ERK1/2 MAPK, p38 MAPK, JNK MAPK, IκBα e IKKα. Para ello utilizamos los siguientes anticuerpos:

- Anticuerpo anti-fosfo-Thr180/Tyr182-p38 MAPK monoclonal de ratón # 9216
- Anticuerpo anti-fosfo-Thr183/Tyr185-SAPK/JNK de conejo policlonal
- Anticuerpo anti-fosfo-Ser32-IκBα de conejo monoclonal # 2859
- Anticuerpo anti-fosfo-Ser176/ 80-IKKα/β de conejo policlonal 2687, y la forma total de estas quinasas, 9102-conejo policlonal
- Anti-p44/42 Anticuerpo anticuerpo anti-JNK1/3 (C-17) de conejo policlonal # 921
- Anticuerpo anti-p38 MAPK forma total, de conejo policlonal

- Anticuerpo anti-JNK1/3 (C-17) de conejo policlonal # 9149
- Anticuerpo anti-IkB α forma total de conejo policlonal
- Anticuerpo anti-IKK α total de conejo policlonal 2682

Todos los anticuerpos fueron diluidos en albúmina de suero bovino al 4% en solución salina tamponada con Tris con Tween 20 al 0.1% (TBS-T) (bloque BSA Buffer de rey). Todos los geles para cada una de las proteínas determinadas fueron revelados junto con un patrón interno (preparado con los mismos procedimientos que los aplicados para las muestras de prueba usando una biopsia del músculo vasto lateral obtenida de un humano sano). Para reducir la variabilidad entre sujetos debido a los diferentes geles, las densidades de la banda de prueba se normalizaron mediante la densidad estándar interna correspondiente.

Aislamiento de ARN, RT y PCR. Se aisló el ARN total con el mini kit de tejido RNeasy fibrous (Qiagen, Madrid, España), y los sedimentos finales se resuspendieron en 20 μ l de H₂O libre de nucleasa. La pureza de las muestras se evaluó determinando la relación de 260 nm a 280 nm, que

era superior a 1,9 y el ARN total se cuantificó a partir de la absorbancia a 260 nm.

Sintetizamos ADNc a partir de 1 µg de ARN utilizando cebadores hexámeros aleatorios y el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems, Madrid, España).

Las condiciones de transcripción inversa comprendieron una etapa de incubación inicial a 25 ° C durante 10 min para permitir el apareamiento de hexámeros aleatorios, seguido de la síntesis de ADNc a 37 ° C durante 120 min, y la etapa de inactivación final durante 5 min a 95 ° C. La PCR en tiempo real se realizó con un sistema de detección de secuencia ABI 7900 (Applied Biosystems, Madrid, España). Los cebadores con los que se amplian los fragmentos específicos de los genes fueron de la empresa de Thermo Fisher Scientific (Ulm, Alemania). La PCR en tiempo real se realizó por duplicado en un volumen de reacción total de 20 µL usando Maxima SYBR green / ROX qPCR Master Mix (Fermentas, Madrid, España). El protocolo de ciclos térmicos fue el siguiente: la desnaturalización inicial durante 10 minutos a 95 ° C fue seguida por 40 ciclos de 10 segundos a 95 ° C, 10 segundos a 62 ° C y 10 segundos a 72 ° C. La señal de fluorescencia se midió al final de cada paso de extensión a 72 ° C.

El análisis de la curva se realizó para confirmar que solo los productos específicos se amplificaron. Para cada muestra, la expresión del ARNm del gen diana se normalizó con el contenido de ARNm de GAPDH. Los cebadores específicos utilizados para IL-6 fueron GGT CCA GTT GCC TTC TCC (directo) y TGT CAA TTC GTT CTG AAG AGG (inverso); para el gen de limpieza GAPDH, fueron GAA CAT CAT CCC TGC CTC TAC T (adelante) y GTC TAC ATG GCA ACT GTG AGG A (inversa).

3.2.3 Análisis estadístico

Los resultados se han expresado como media \pm S.D. La normalidad de la distribución se verificó con la prueba de Shapiro-Wilk, y la homogeneidad de la varianza se probó usando la prueba de Levene (Levene et col 1960). Los valores medios se compararon con ANOVA para medidas repetidas ajustadas para comparaciones múltiples con el método de Bonferroni-Holm. Además, dado que no hubo diferencias significativas entre las primeras tres biopsias obtenidas de la misma incisión (B1, B2 y B5), estas tres biopsias se promediaron para reducir su variabilidad y se compararon con la sexta biopsia, que se obtuvo de una biopsia previa. región lesionada con una prueba de t de Student. El nivel de significación estadística se estableció

en $P < 0,05$. Utilizamos el software SPSS (versión 13.0.1; SPSS Inc, Chicago, IL) para todos los análisis estadísticos

4 y 5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio 1

Tal y como se ha establecido en el apartado de materiales y métodos realizamos un estudio prospectivo, intervencionista, aleatorizado de la atrofia muscular determinada por resonancia magnética durante la inmovilización de la parte inferior de la pierna en pacientes varones jóvenes (entre 25 y 40 años) con esguince de tobillo (grado II) (Ferrando, et al. 2018).

Las Figuras 6 y 7 muestran el diagrama de flujo del progreso del ensayo clínico aleatorizado paralelo de dos grupos y en el que se incluye: reclutamiento, asignación de la intervención, seguimiento y análisis.

Figura 6. Diagrama de flujo del ensayo clínico aleatorizado paralelo de dos grupos.

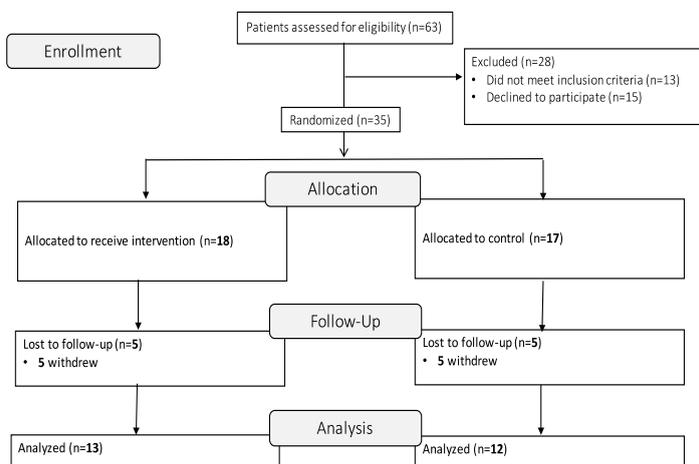
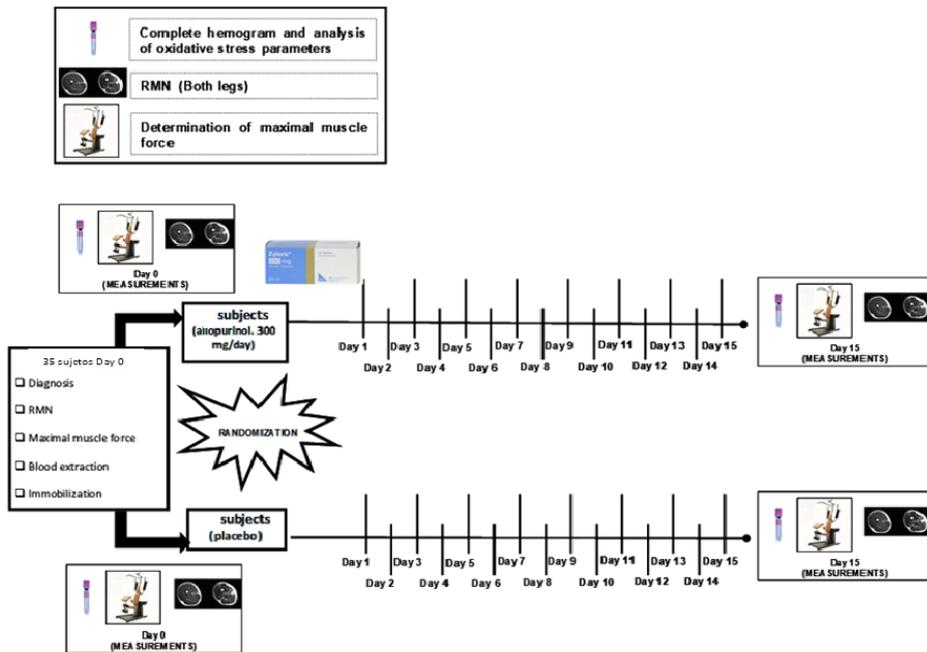


Figura 7. Diagrama de aleatorización y seguimiento de pacientes en ensayo clínico



Tal y como muestra el diagrama, 18 pacientes fueron asignados al grupo intervención, mientras que 17 fueron incluidos en el grupo control. Tras la aleatorización, 13 pacientes fueron tratados con alopurinol y 12 no

recibieron ningún tratamiento (control) durante todo el período de inmovilización.

Los pacientes pertenecientes al grupo intervención siguieron un tratamiento con 300 mg diarios de alopurinol por vía oral en formato comprimido, durante las dos semanas que duró la inmovilización. La medicación se entregó al paciente en el momento de su aceptación para participar en el ensayo clínico. Se administró un frasco con 15 comprimidos al grupo de tratamiento. El grupo control no recibió tratamiento alguno.

Transcurridos los 14 días de intervención se dejó de administrar la medicación. Se realizó una analítica de control a los 7 días de tratamiento para objetivar que no había efectos indeseados del fármaco y poder comprobar si se estaba modificando el valor del ácido úrico. Se realizó un seguimiento de 1 mes posterior al finalizar el tratamiento para información de posibles efectos adversos y dudas de los pacientes de estudio.

La Tabla 3 muestra los parámetros bioquímicos que fueron determinados en sangre en los pacientes pertenecientes al estudio, tanto antes como tras la intervención.

No encontramos diferencias significativas entre el grupo control y el grupo alopurinol en ningún marcador de daño inflamatorio, hepático o muscular. Tampoco

encontramos diferencias en las determinaciones hematológicas básicas cuando comparamos los dos grupos experimentales.

En nuestro estudio incluimos la cuantificación de los niveles de ácido úrico en todos los pacientes para probar la eficacia del tratamiento con alopurinol. No encontramos ninguna diferencia entre los niveles de ácido úrico en el grupo control antes ($5,9 \pm 0,8 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$) y después de la inmovilización ($5,9 \pm 0,7 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$). Como era de esperar, encontramos una disminución significativa en los niveles de ácido úrico en los sujetos tratados con alopurinol después de la inmovilización ($3,7 \pm 0,5 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$) en comparación con sus valores antes de la misma ($5,7 \pm 0,6 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$) ($p < 0,05$).

Tabla 3. Parámetros bioquímicos en sangre. Efecto del tratamiento con alopurinol.

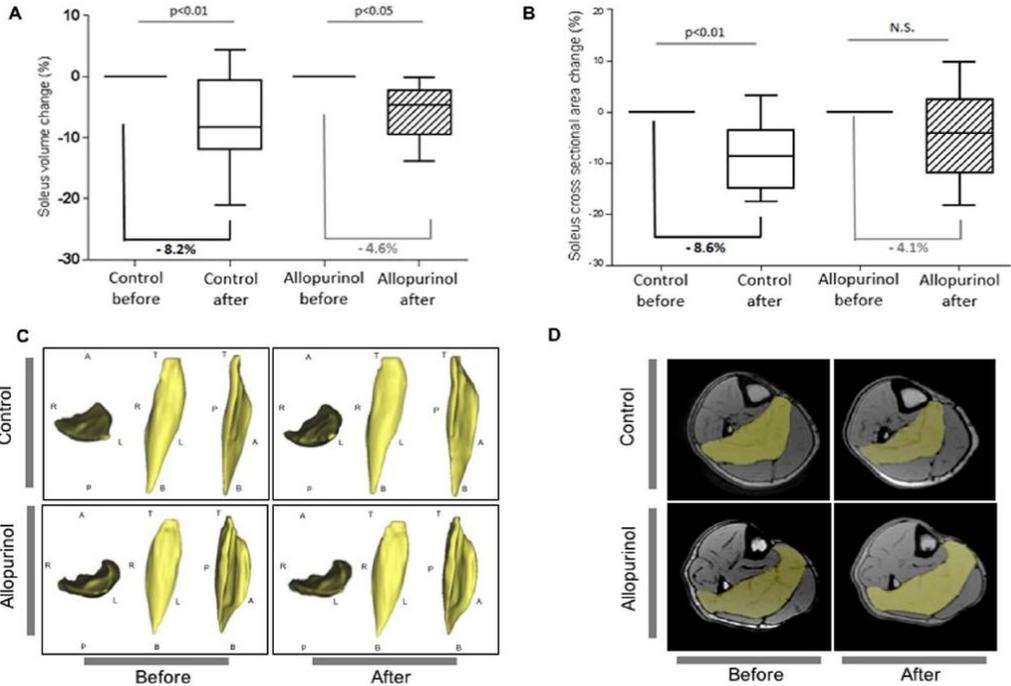
	Antes de inmovilización		Después de inmovilización	
	Control	Allopurinol	Control	Allopurinol
PCR (mg·L ⁻¹)	3.90±4.44	3.93±5.72	1.69±1.11	1.90±1.63
Leucocitos (10 ³ ·uL ⁻¹)	8.56±2.71	8.41±2.94	6.91±0.96	7.36±1.60
Neutrofilos (10 ³ ·uL ⁻¹)	5.40±2.27	5.92±2.97	4.00±0.70	4.67±1.60
Linfocitos (10 ³ ·uL ⁻¹)	2.33±0.48	1.72±0.52	2.18±0.51	1.96±0.81
Monocitos (10 ³ ·uL ⁻¹)	0.66±0.21	0.56±0.27	0.58±0.13	0.47±0.16
Eosinofilos (10 ³ ·uL ⁻¹)	0.14±0.12	0.18±0.13	0.15±0.08	0.23±0.15
Basofilos (10 ³ ·uL ⁻¹)	0.02±0.04	0.00±0.00	0.01±0.02	0.01±0.01
Hemoglobina (g·dL ⁻¹)	15.35±0.72	14.69±1.00	15.47±0.64	14.97±0.85
Hematrocrito (%)	45.25±1.55	44.31±2.10	45.28±1.43	44.74±1.96
Plaquetas (10 ³ ·uL ⁻¹)	226.50±49.70	223.29±46.04	249.80±39.16	240.00±68.81
Glucosa (mg·dL ⁻¹)	83.91±7.57	89.14±16.03	81.45±7.57	96.71±16.92
Colesterol (mg·dL ⁻¹)	206.33±66.83	188.60±32.85	199.89±56.63	208.00±19.62
Triglicéridos (mg·dL ⁻¹)	143.38±91.79	122.60±62.46	138.88±70.33	139.20±76.55
Creatina (mg·dL ⁻¹)	0.92±0.11	0.92±0.15	0.92±0.10	0.89±0.08
GPT (U·L ⁻¹)	36.93±36.15	20.42±7.12	37.07±21.77	32.17±37.29
GOT (U·L ⁻¹)	28.21±11.70	24.64±6.89	29.36±14.84	24.45±6.14
Urea (mg·dL ⁻¹)	38.22±7.08	28.00±10.86	35.32±6.76	31.50±6.61
LDH (U·L ⁻¹)	421.67±77.51	383.33±46.36	374.67±71.22	393.67±74.89
Creatin Kinasa (U·L ⁻¹)	133.75±46.33	189.50±79.90	76.88±54.94	83.10±107.34

La Figura 8 muestra que 15 días de descarga unilateral de las extremidades inferiores causa una disminución significativa en el volumen (8,2%, $p < 0,01$) (Figura 8, paneles A y C) y área de la sección transversal (8,6%, $p < 0,01$) del músculo sóleo (Figura 8, paneles B y D).

El tratamiento con alopurinol evitó parcialmente la disminución en el área de sección transversal del sóleo en los pacientes inmovilizados (4,1%), lo que hace que la diferencia entre antes y después de la inmovilización no sea significativa (véase la Figura 8B). Sin embargo, no encontramos una prevención en la disminución del volumen del sóleo en los pacientes inmovilizados y tratados con alopurinol (4,6%) (Ver Figura 8A). Aunque la disminución en el volumen fue menor a la que experimentaron los pacientes que no siguieron el tratamiento, ésta no alcanzó la significación estadística.

La atrofia del músculo esquelético puede ocurrir en respuesta a la inmovilización, en condiciones patológicas y en el envejecimiento normal (sarcopenia primaria). En estudios en humanos, la cuantificación del área de sección transversal muscular se ha utilizado comúnmente en la evaluación de atrofia muscular.

Figura 8. Cuantificación del volumen y área de sección transversal del músculo sóleo por MRI en pacientes inmovilizados durante dos semanas.



(A) Cuantificación de los cambios en el volumen y (B) en el área de sección transversal del músculo sóleo durante la inmovilización de la parte inferior de la pierna con una férula de tobillo. (C) Imágenes de volumen representativas después del análisis y la segmentación del músculo sóleo en sujetos control y tratados con alopurinol. R = derecha, L = izquierda, A = anterior, P = posterior, T = arriba, B = abajo. (D) Imágenes de resonancia magnética representativas del estudio. El músculo sóleo se representa en amarillo.

En estudios publicados previamente por nuestro grupo de investigación hemos demostrado que el tratamiento con alopurinol reduce el estrés oxidativo (Gomez Cabrera et al. 2003)(Derbre et al. 2012), previene el daño muscular (Sanchis-Gomar et al. 2015) y se puede asociar con un mayor grado de mejora en la funcionalidad física en el adulto mayor (Ferrando et al. 2014). En este sentido Beveridge y colaboradores encontraron incrementos en la puntuación en la escala de Barthel durante la rehabilitación en una población de pacientes hospitalizados de edad avanzada cuando el programa de ejercicio se acompañaba con la administración de alopurinol (Beveridge et al 2013).

En esta tesis doctoral hemos encontrado una pérdida significativa en el área de sección transversal del sóleo en pacientes inmovilizados durante 15 días con una férula de tobillo (8,6%, $p < 0,05$). El tratamiento con alopurinol previno parcialmente esta disminución en los pacientes inmovilizados y tratados (4,1%) (Ver Figura 8). Para destacar la importancia clínica del efecto del alopurinol, lo hemos comparado con el ejercicio, la forma más conocida de prevenir la pérdida de masa muscular en modelos humanos de atrofia por desuso (Baldwin et al. 1996).

En la Tabla 4 se muestran los principales estudios en humanos en los que se ha cuantificado el papel del entrenamiento de fuerza en la atrofia de flexores (o

específicamente del músculo sóleo) inducida por distintos tipos de protocolos de atrofia: encamamiento, inmovilización o suspensión de miembros inferiores.

Tabla 4. Resumen de los estudios en humanos en los que se ha utilizado el ejercicio en el tratamiento de la atrofia del flexor plantar y del músculo sóleo. Comparación con los resultados obtenidos en nuestro estudio.

	Nº sujetos	Medidas	Protocolo	Tratamiento	Grupo control % cambio	Grupo intervención % cambio	% prevención
Nuestro estudio	25 pacientes	Sóleo CSA	15 d de inmovilización	300 mg/día de allopurinol	↓8.6% (p<0,05)	↓4.1% (NS)	52%
Akima, H 2000	9 hombres sanos	Sóleo PCSA	20 d de cama	Isométricos prensa de pierna	↓15% (p<0,05)	↓10.6% (p<0,05)	29%
Akima, H 2001	15 hombres sanos	Sóleo PCSA	20 d de cama	Ejercicios dinámicos de prensa y flexión de tobillo	↓12.1% (p<0,01)	↓9.8% (p<0,01)	19%
Schulze, K 2002	16 hombres sanos	Flexor plantar CSA	21 d de suspensión de una pierna	Entrenamiento de alta intensidad	↓7.0% (p<0,05)	-0%	7%
Akima, H 2003	12 hombres sanos	Flexor plantar PCSA	20 d de cama	Prensa de pierna y flexión tobillo	↓12.7% (p<0,05)	↓3.2% (NS)	75%
Hotta, N 2011	11 hombres sanos	Flexor plantar CSA	20 d suspensión de una pierna	Entrenamiento en bici (80% of VO _{2peak})	↓11.2% (p<0,05)	↓7.0% (p<0,05)	37%

PCSA: Área de sección transversal fisiológica= Volumen muscular x coseno del ángulo de penetración de la fibra muscular x (longitud de la fibra)⁻¹. NS: No significativo

La disminución en el tamaño del músculo de nuestros pacientes es similar a los datos de una serie de

estudios que informan disminuciones de 7 a 15% tras 20 días de reposo en cama o descarga unilateral de miembros inferiores. La tabla 4 muestra que nuestra intervención (300 mg de alopurinol diario), parece ser tan eficaz como el ejercicio para la prevención de la atrofia (Ferrando et al. 2018). En este sentido, es importante destacar que la respuesta atrófica parece ser mayor en el músculo sóleo que en el gastrocnemio medial y lateral, tanto en modelos animales como en humanos (Ferrando et al. 2018). Por lo tanto, prevenir la atrofia en este tipo muscular (en el sóleo) es especialmente relevante.

En este estudio no pudimos obtener biopsias del músculo sóleo de los pacientes. Sin embargo, la comparación de la atrofia inducida por desuso en roedores y humanos sugiere que existen considerables similitudes en el proceso, y que la mayor diferencia parece estar en la tasa a la que la atrofia ocurre, siendo la pérdida de masa muscular en los roedores considerablemente más rápida que en los humanos (Reid et al. 2001).

Existen evidencias que muestran el papel protector del alopurinol en la prevención de disfunción muscular causada por descarga prolongada o ventilación mecánica en animales de experimentación (Derbre et al. 2014). Además, se ha encontrado que la inhibición de la xantina oxidasa con alopurinol reduce la pérdida de masa muscular y mejora la supervivencia en un modelo de caquexia por

cáncer en un modelo de rata (Springer et al. 2012). Por otra parte, el tratamiento con febuxostat (un novedoso inhibidor selectivo de XO no purina) atenúa la progresión de la caquexia en ratas portadoras de tumores a través del aumento en la relación pAkt/Akt en el músculo gastrocnemio (Konishi et al. 2015)

En condiciones de atrofia, hay un cambio en el equilibrio de la síntesis y degradación de proteínas que resulta en una pérdida neta de proteínas musculares (Bodine, 2013). Existe una clara evidencia en modelos de roedores de desuso (Kelleher et al. 2014) pero también en humanos (Ferrando et al. 1996), que muestran que la tasa de síntesis de proteínas basales disminuye inmediatamente después de la descarga y permanece en un nivel suprimido durante toda la duración de la intervención.

Tras las evidencias mostradas, consideramos que el efecto protector del alopurinol puede estar mediado por la modulación de ERO en el músculo esquelético de los pacientes sometidos a un protocolo de inmovilización.

Estudio 2

En este segundo estudio nos planteamos establecer un protocolo óptimo de obtención de biopsias musculares humanas con potencial traslacional en los estudios de

atrofia muscular para reducir su invasividad y sin inducir artefactos experimentales (Guerra et al. 2011).

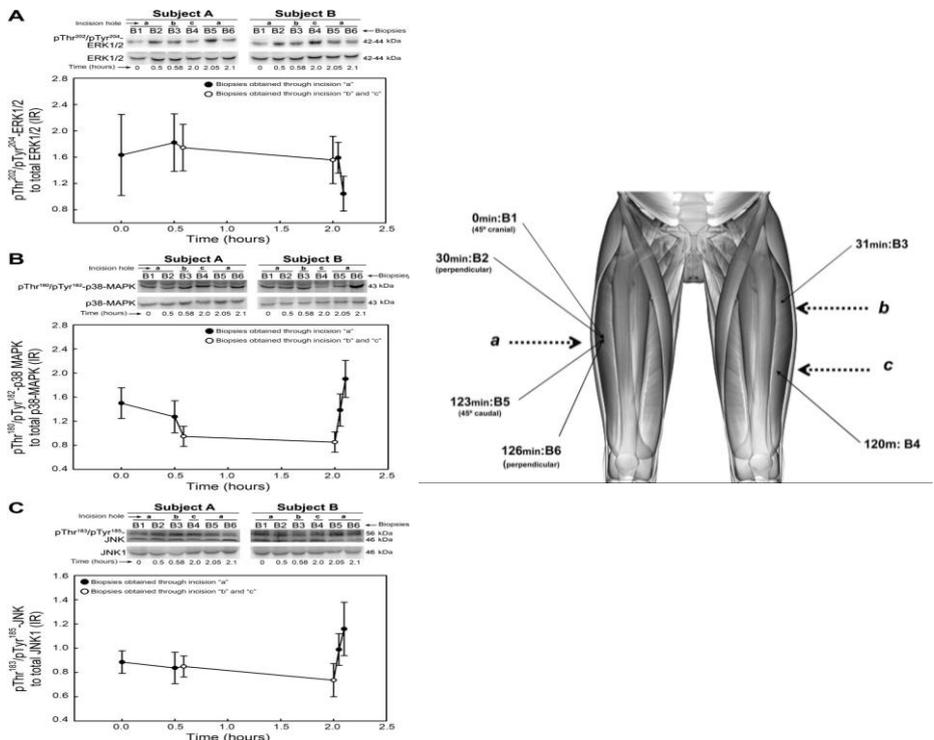
Para ello analizamos distintas cascadas de señalización celular en 6 biopsias musculares consecutivas (4 realizadas en pierna derecha y 2 realizadas en pierna izquierda) en 5 sujetos sanos, utilizando para su obtención la misma incisión (Ver Figura 5).

La fosforilación de ERK1/2 fue similar en ambas piernas cuando se compararon las biopsias obtenidas a través de nuevas incisiones (B1, B3 y B4; Figura 9A).

La misma incisión (incisión A) se usó para obtener biopsias musculares posteriores 30 y 90 minutos más tarde (B2 y B5) con la aguja de biopsia dirigida hacia diferentes áreas del músculo y produjo niveles similares de fosforilación de ERK1/2. La última biopsia (B6), que se obtuvo de la misma área que la biopsia B2, es decir, un área muscular previamente lesionada, también tenía niveles similares de fosforilación de ERK1/2 en comparación con las biopsias obtenidas casi al mismo tiempo de la pierna contralateral (B4: "Nueva incisión") y desde la misma pierna solo 3 minutos antes ($P=0.08$). Se obtuvieron resultados similares para los niveles de fosforilación de p38-MAPK y JNK, es decir, niveles similares de fosforilación para ambas piernas cuando se

compararon las biopsias obtenidas mediante nuevas incisiones (B1, B3 y B4; Figura 9 B y C)

Figura 9. Niveles de Thr202/Tyr204-ERK1/2, Thr180/Tyr182-p38 MAPK y Thr183/Tyr185 JNK en biopsias musculares obtenidas a través de la misma incisión o a través de nuevas incisiones.

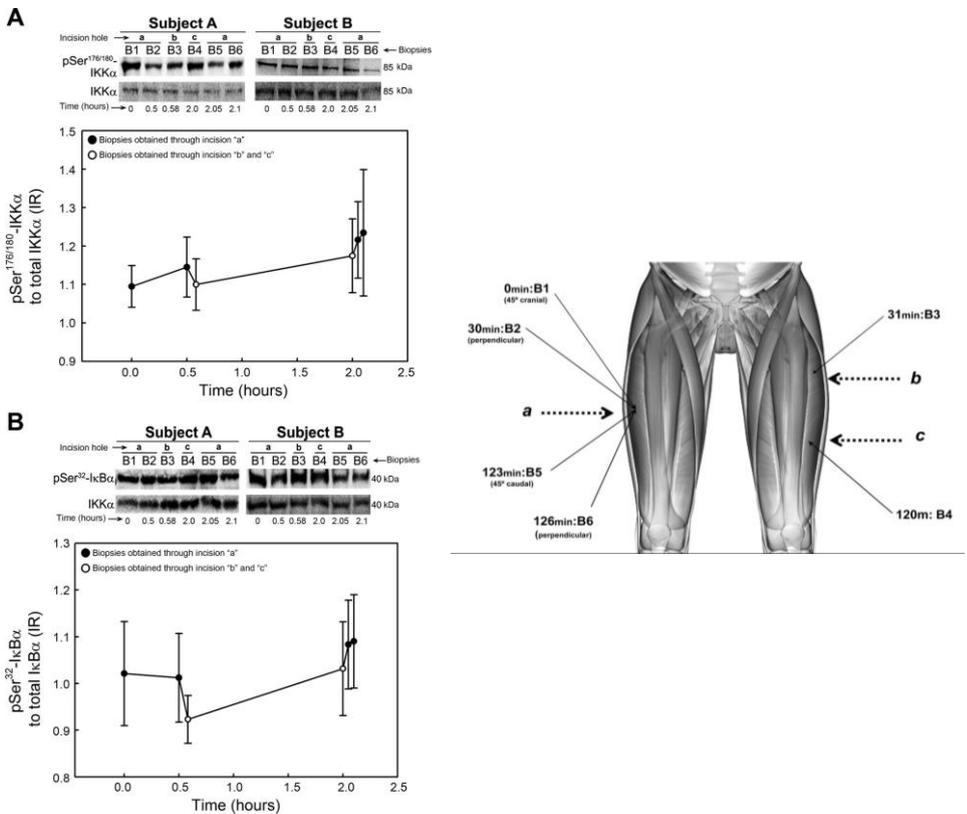


Western Blottings representativos y análisis densitométricos de inmunotransferencias (B1 a B6). Cada punto representa la media de 5 sujetos y la DE. Los valores son relativos a los valores de MAPKs totales

Las tres biopsias realizadas en la misma incisión también mostraron niveles similares de p38-MAPK, JNK, IKK α , I κ B α (Figura 9, A, B y C; Figura 10, A y B). No hubo

una diferencia significativa en los niveles de fosforilación de ERK1/2, p38-MAPK, JNK, IKK α e I κ B α entre la media de las tres biopsias obtenidas a través de la misma incisión [(B1+B2+B5)/3] y la sexta biopsia (Figura 9, A, B y C; Figura 10, A y B, respectivamente).

Figura 10. Niveles de fosforilación de Ser176/180-IKK α (A) y Ser32-I κ B α (B) en biopsias musculares obtenidas a través de la misma incisión o de nuevas incisiones.



Western blottings representativos y análisis densitométricos de inmunotransferencias (B1 a B6). Cada punto representa la media de 5 sujetos y la DE. Los valores son relativos a los valores de MAPKs totales.

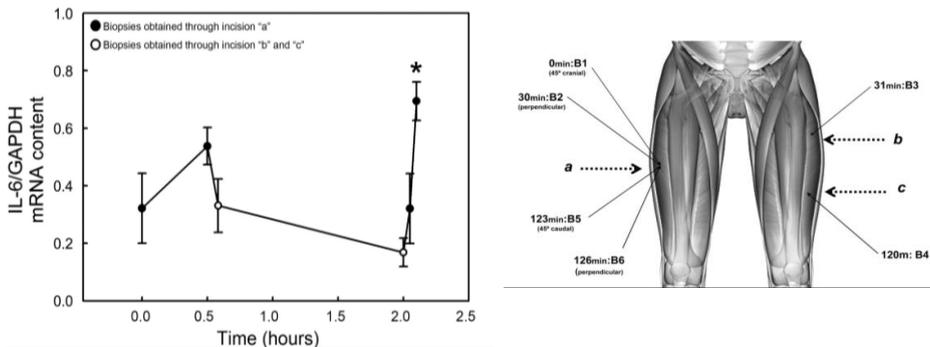
Nuestro estudio muestra que la biopsia percutánea del músculo esquelético se puede obtener a través de una sola incisión de 5 a 6 mm sin provocar cascadas de señalización involucradas en la respuesta celular al estrés o inflamación dentro de las primeras 2 horas. Esto también significa que realizar una pequeña incisión de la piel para obtener una biopsia muscular 30 a 90 minutos más tarde no induce este tipo de señalización en el músculo esquelético localizado 2-3 cm por debajo de la lesión cutánea. Tampoco encontramos una activación de las MAPKs cuando la biopsia muscular se obtuvo de un área ya biopsiada 90 minutos antes.

Nuestros resultados concuerdan con estudios previos en los que no se encontró una fosforilación de ERK1/2 y p38-MAPK en biopsias obtenidas de la misma incisión con 30 y 90 min de separación en zonas musculares distanciadas como mínimo 3 cm (Guerra et al. 2010). Por el contrario, el grupo de investigación de del Dr. Richter (Aronson et al. 1998) informó un aumento de la fosforilación de ERK1/2 y un aumento de las actividades de p38-MAPK y JNK 30 minutos después de una primera biopsia cuando la segunda muestra se obtuvo a través de la misma incisión. En nuestro caso observamos que cuando se toman muestras de la misma incisión, pero dirigiendo la aguja hacia diferentes zonas musculares o incluso cuando supuestamente obtuvimos la biopsia

muscular de una región previamente lesionada (B6 tomada desde el mismo punto que B2) no se producía esta activación. Esta discrepancia puede deberse a varios factores. En primer lugar, a la técnica utilizada para obtener la biopsia muscular. En su artículo, Aronson y colaboradores (Aronson et al. 1998), no mencionan si la aguja de biopsia se introdujo en una dirección diferente cuando se obtuvo una segunda biopsia de la misma incisión. En segundo lugar, la fosforilación de ERK1/2 puede haber sido inducida por el anestésico local (Maurice et al. 2010). Aunque usamos el mismo tipo de anestésico que Aronson y colaboradores el procedimiento utilizado de infiltración en el músculo podría haber sido diferente y es posible que algo de lidocaína pudiese haber alcanzado las áreas musculares de las que se obtuvieron las biopsias repetidas. Tercero, nuestra última biopsia (la que tomamos de un área pre-biopsiada) se obtuvo 90 min después de la biopsia "lesionante", no podemos descartar una transitoria respuesta de fosforilación de ERK1/2 en el músculo lesionado a los 30 o 60 min, seguido de una disminución a los valores basales a los 90 min. Sin embargo, consideramos improbable esta tercera posibilidad, particularmente teniendo en cuenta el valor tan elevado de activación que obtuvimos de ERK1/2.

El contenido de ARNm de IL-6 muscular fue 1,8 veces mayor en la sexta biopsia en comparación con la media de las tres biopsias previas obtenidas de la primera incisión $[(B1+B2+B5)/3]$ ($P<0,05$), Figura 11).

Figura 11. Niveles de expresión de IL-6 en biopsias musculares obtenidas a través de la misma incisión o a través de nuevas incisiones.



*El contenido de ARNm de IL-6 se midió en las 6 biopsias musculares obtenidas de 5 sujetos mediante RT-PCR en tiempo real, cada punto representa la media de 5 sujetos y las barras de errores son DE. La expresión del ARNm se normalizó con el contenido de ARNm de GAPDH. * $P<0,05$ frente a la media de las 3 biopsias anteriores obtenidas de la misma incisión $[(B1+B2+B5)/3]$*

Estos resultados concuerdan con la observación del aumento de la proteína intersticial IL-6 en modelos de roedores con traumatismo del músculo esquelético dentro de las primeras 2 horas (Farnebo et al. 2009) y con el hallazgo de aumento de IL-6 ARNm en ruptura de tendones del manguito rotador (Nakama et al. 2006).

El aumento de ARNm de IL-6 no parece estar mediado por las vías de señalización MEK/ERK o IKK α /I κ B α /NF- κ B. Mecanismos alternativos, como los aumentos inducidos por alteraciones en el calcio intramiocelular, podrían haber mediado el rápido aumento en el ARNm de IL-6 (Allen et al. 2010).

La respuesta de IL-6 parece limitarse al área muscular lesionada y no es causada por la incisión de la piel. Esto implica que utilizar la misma incisión en la piel no favorece el incremento de mediadores potenciales de inflamación. El aumento del ARNm de IL-6 es un evento temprano en la respuesta aguda del músculo esquelético a una lesión quirúrgica, que se limita al área lesionada y no a los 3 cm de diferencia de la zona biopsiada.

6.- CONCLUSIONES

- 1- La administración de alopurinol en pacientes inmovilizados unilateralmente durante 14 días previene en un 52% la pérdida de la sección transversal del músculo sóleo cuantificado a través de pruebas de imagen por Resonancia Magnética.
- 2- La administración de alopurinol en paciente inmovilizados unilateralmente durante 14 días previene en un 43% la pérdida del volumen del músculo sóleo cuantificado a través de pruebas de imagen por Resonancia Magnética.
- 3- La administración de alopurinol en paciente inmovilizados unilateralmente durante 14 días no tiene ningún efecto en cuanto a los parámetros sanguíneos de daño inflamatorio, hepático o muscular.
- 4- La obtención de biopsias percutáneas repetidas realizadas a través de la misma incisión, utilizando la aguja tipo Bergström, no tiene efectos sobre la activación de la vía de señalización de la protein kinasas activadas por mitógenos (MAPKs) ERK $\frac{1}{2}$,

p38 y JNK, en el músculo esquelético de sujetos sanos.

- 5- El aumento del ARNm de IL-6 es un evento temprano en la respuesta aguda del músculo esquelético a una lesión quirúrgica, que se limita al área lesionada y no a los 3 cm de diferencia de la zona biopsiada en un protocolo de obtención de biopsias percutáneas repetidas realizadas a través de la misma incisión, utilizando la aguja tipo Bergström.
- 6- Nuestros resultados muestran que se pueden realizar biopsias musculares repetidas a través de una única incisión cutánea de 5 a 6 mm sin provocar señales musculares a través de cascadas que respondan al estrés celular, la inflamación o el daño muscular.

7.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akima, H. et al. Leg-press resistance training during 20 days of 6 degrees head-down-tilt bed rest prevents muscle deconditioning. *Eur J Appl Physiol* 82, 30–38 2000
- Akima, H. et al. Inactivity and muscle: effect of resistance training during bed rest on muscle size in the lower limb. *Acta Physiol Scand* 172, 269–278 2001.
- Akima, H. et al. Resistance training during unweighting maintains muscle size and function in human calf. *Med Sci Sports Exerc* 35, 655–662 2003
- Allen DL, Uyenishi JJ, Cleary AS, Mehan RS, Lindsay SF, Reed JM. Calcineurin activates interleukin-6 transcription in mouse skeletal muscle in vivo and in C2C12 myotubes in vitro. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298: R198–R210, 2010.
- Ames, B. N. 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, 221, 1256-64.
- Aronson D, Wojtaszewski JF, Thorell A, Nygren J, Zangen D, Richter EA, Ljungqvist O, Fielding RA, Goodyear LJ. Extracellular-regulated protein kinase cascades are activated in response to injury in humanskeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 275: C555–C561, 1998
- Baldwin, K. M. et al. Musculoskeletal adaptations to weightlessness and development of effective countermeasures. *Med Sci SportsExerc* 28, 1247–1253 (1996)
- Bergstrom J 1975 Percutaneous needle biopsy of skeletal muscle in physiological and clinical research. *Scand J Clin Lab Invest.* Nov;35(7):609-16.
- Beveridge, L. A., Ramage, L., McMurdo, M. E. T., George, J. & Witham, M. D. 2013. Allopurinol use is associated with greater functional gains in older rehabilitation patients. *Age Ageing*, 42, 400-4.
- Bodine, S. C. Disuse-induced muscle wasting. *Int J*

- Biochem Cell Biol 45, 2200–2208 (2013)
- Buckey, J. 2006. Muscle loss: approach to maintaining strength. *In: Space physiology. New York (NY): Oxford University Press, 77-100.*
- Byers, T. & Bowman, B. 1993. Vitamin E supplements and coronary heart disease. *Nutr Rev, 51, 333-6.*
- Cross, A. J., Slater, P., Simpson, M., Royston, C., Deakin, J. F., Perry, R. H. & Perry, E. K. 1987. Sodium dependent D-[³H]aspartate binding in cerebral cortex in patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neurosci Lett, 79, 213-7.*
- Cheeseman, K. H. & Slater, T. F. 1993. An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull., 49, 588-603.*
- Davies, K. J., Quintanilha, A. T., Brooks, G. A. & Packer, L. 1982a. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun, 107, 1198-205.*
- Davies, K. J. A., Delsignore, M. E. & Lin, S. W. 1987a. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J. Biol. Chem., 262, 9902-9907.*
- Derbre F, Ferrando B, Gomez-Cabrera MC, Sanchis-Gomar F, Martinez-Bello VE, Olaso-Gonzalez G, Diaz A, Gratas-Delamarche A, Cerda M, Viña J. Inhibition of xanthine oxidase by allopurinol prevents skeletal muscle atrophy: role of p38 MAPKinase and E3 ubiquitin ligases. *PLoS One. 2012;7(10):e46668.*
- deDuve, C. & Baudhuin, P. 1966. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiology Reviews, 46, 323-357.*
- Doherty, T. J. 2003. Invited review: Aging and sarcopenia. *J Appl Physiol, 95, 1717-27.*
- Du, J., Wang, X., Miereles, C., Bailey, J. L., Debigare, R., Zheng, B., Price, S. R. & Mitch, W. E. 2004. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest, 113, 115-23.*
- Eklblom B 2017 The muscle biopsy technique. Historical

- and methodological considerations 2017 May;27(5)
- Elion, G. B., Kovensky, A. & Hitchings, G. H. 1966. Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase. *Biochem Pharmacol*, 15, 863-80.
- Farnebo S, Lars-Erik K, Ingrid S, Sjogren F, Folke S. Continuous assessment of concentrations of cytokines in experimental injuries of the extremity. *Int J Clin Exp Med* 2: 354–362, 2009.
- Ferrando, A. A., Lane, H. W., Stuart, C. A., Davis-Street, J. & Wolfe, R. R. Prolonged bed rest decreases skeletal muscle and wholebody protein synthesis. *Am J Physiol* 270, E627–633 (1996).
- Ferrando B, Olaso-Gonzalez G, Sebastia V, Viosca E, Gomez-Cabrera MC, Viña J. Alopurinol y su papel en el tratamiento de la sarcopenia [Allopurinol and its role in the treatment of sarcopenia]. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2014;49(6):292-8.
- Ferrando B, Gomez-Cabrera MC, Salvador-Pascual A, Puchades C, Derbré F, Gratas-Delamarche A, Laparre L, Olaso-Gonzalez G, Cerda M, Viosca E, Alabajos A, Sebastián V, Alberich-Bayarri A, García-Castro F, Viña J. Allopurinol partially prevents disuse muscle atrophy in mice and humans. *Sci Rep*. 2018 23;8(1):3549.
- Freeman, B. A. & Crapo, J. 1982a. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, 47, 412-426.
- Freeman, B. A. & Crapo, J. D. 1982b. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, 47, 412-26.
- Fridovich, I. 1974. Superoxide dismutase. *Adv. Enzymol.*, 41, 35-97.
- Furuno, K. & Goldberg, A. L. 1986. The activation of protein degradation in muscle by Ca²⁺ or muscle injury does not involve a lysosomal mechanism. *Biochem J*, 237, 859-64.
- Glatigny, A. & Scazzocchio, C. 1995. Cloning and molecular characterization of hxA, the gene coding for the xanthine dehydrogenase (purine hydroxylase I) of *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem*, 270, 3534-

50.

- Godber, B. L., Doel, J. J., Durgan, J., Eisenthal, R. & Harrison, R. 2000. A new route to peroxyxynitrite: a role for xanthine oxidoreductase. *FEBS Lett*, 475, 93-6.
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W. & Cong, J. 2003. The calpain system. *Physiol Rev*, 83, 731-801.
- Gomez-Cabrera, M. C., Pallardo, F. V., Sastre, J., Vina, J. & Garcia-del-Moral, L. Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France. *Jama* 289, 2503–2504 (2003)
- Guerra B, Santana A, Fuentes T, Delgado-Guerra S, Cabrera-Socorro A, Dorado C, Calbet JA. Leptin receptors in human skeletal muscle. *JAppl Physiol* 102:1786–1792, 2007
- Guerra B, Guadalupe-Grau A, Fuentes T, Ponce-Gonzalez JG, MoralesAlamo D, Olmedillas H, Guillen-Salgado J, Santana A, Calbet JA. SIRT1, AMP-activated protein kinase phosphorylation and downstream kinases in response to a single bout of sprint exercise: influence of glucose ingestion. *Eur J Appl Physiol* 109: 731–743, 2010
- Guerra B, Gómez-Cabrera MC, Ponce-González JG, Martínez-Bello VE, Guadalupe-Grau A, Santana A, Sebastia V, Viña J, Calbet JA. Repeated muscle biopsies through a single skin incision do not elicit muscle signaling, but IL-6 mRNA and STAT3 phosphorylation increase in injured muscle. *J Appl Physiol* (1985). 2011 Jun;110(6):1708-15.
- Halliwell, B. 1994. Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence? *Lancet*, 344, 721-724.
- Halliwell B, G. J. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. *London: Oxford Univ. Press.*
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med*, 18, 125-6.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. 1989. *Free radicals in biology and medicine.*, Oxford, Clarendon Press.

- Halliwell, B. a. J. M. C. G. 1985. Free Radicals in Biology and Medicine. . Oxford, Clarendon Press.
- Hassan, H. M. & Fridovich, I. 1977. Regulation of the synthesis of superoxide dismutase in *Escherichia coli*. Induction by methyl viologen. *J Biol Chem*, 252, 7667-72.
- Hasselgren, P. O., Wray, C. & Mammen, J. 2002. Molecular regulation of muscle cachexia: it may be more than the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun*, 290, 1-10.
- Hellsten, Y., Frandsen, U., Orthenblad, N., Sjodin, B. & Richter, E. A. 1997. Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: a role in inflammation. *J Physiol*, 498 (Pt 1), 239-48.
- Hotta, N. *et al.* The effect of intense interval cycle-training on unloading-induced dysfunction and atrophy in the human calf muscle. *J Physiol Anthropol* **30**, 29–35 2011
- Ichida, K., Amaya, Y., Noda, K., Minoshima, S., Hosoya, T., Sakai, O., Shimizu, N. & Nishino, T. 1993. Cloning of the cDNA encoding human xanthine dehydrogenase (oxidase): structural analysis of the protein and chromosomal location of the gene. *Gene*, 133, 279-84.
- Ikemoto, M., Nikawa, T., Takeda, S., Watanabe, C., Kitano, T., Baldwin, K. M., Izumi, R., Nonaka, I., Towatari, T., Teshima, S., Rokutan, K. & Kishi, K. 2001. Space shuttle flight (STS-90) enhances degradation of rat myosin heavy chain in association with activation of ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J*, 15, 1279-81.
- Jackman, R. W. & Kandarian, S. C. 2004. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287, C834-43.
- Javesghani, D., Magder, S. A., Barreiro, E., Quinn, M. T. & Hussain, S. N. 2002. Molecular characterization of a superoxide-generating NAD(P)H oxidase in the ventilatory muscles. *Am J Respir Crit Care Med*, 165, 412-8.

- Kelleher, A. R., Pereira, S. L., Jefferson, L. S. & Kimball, S. R. REDD2 expression in rat skeletal muscle correlates with nutrient-induced activation of mTORC1: responses to aging, immobilization, and remobilization. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 308, E122–129 (2014)
- Kobzik, L., Reid, M. B., Bredt, D. S. & Stamler, J. S. 1994. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature*, 372, 546-8.
- Kondo, H., Miura, M. & Itokawa, Y. 1991. Oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Acta Physiol Scand*, 142, 527-8.
- Kondo, H., Miura, M. & Itokawa, Y. 1993b. Antioxidant enzyme systems in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Pflugers Arch*, 422, 404-6.
- Kondo, H., Miura, M., Kodama, J., Ahmed, S. M. & Itokawa, Y. 1992a. Role of iron in oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Pflugers Arch*, 421, 295-7.
- Kondo, H., Miura, M., Nakagaki, I., Sasaki, S. & Itokawa, Y. 1992b. Trace element movement and oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am J Physiol*, 262, E583-90.
- Kondo, H., Nakagaki, I., Sasaki, S., Hori, S. & Itokawa, Y. 1993c. Mechanism of oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am J Physiol*, 265, E839-44.
- Kondo, H., Nishino, K. & Itokawa, Y. 1994. Hydroxyl radical generation in skeletal muscle atrophied by immobilization. *FEBS Lett*, 349, 169-72.
- Konishi, M. et al. Febuxostat improves outcome in a rat model of cancer cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 6, 174–180(2015)
- Kourie, J. I. 1998. Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am J Physiol*, 275, C1-24.
- Krenitsky, T. A., Tuttle, J. V., Cattau, E. L. & Wang, P. 1974. A comparison of the distribution and electron acceptor specificities of xanthine oxidase and

- aldehyde oxidase. *Comp Biochem Physiol B*, 49, 687-703.
- Lawler, J. M., Song, W. & Demaree, S. R. 2003. Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*, 35, 9-16.
- Levene H. Robust tests for equality of variances. In: Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling, edited by Olkin I, Ghurye SG, Hoeffding W, Madow WG, Mann HB. Palo Alto, CA:Stanford University Press, 1960, p. 278–292
- Li, Y. P. & Reid, M. B. 2000. NF-kappaB mediates the protein loss induced by TNF-alpha in differentiated skeletal muscle myotubes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279, R1165-70.
- Massey, V., Schopfer, L. M. & Nishino, T. 1989. Differences in protein structure of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase revealed by reconstitution with flavin active site probes. *J Biol Chem*, 264, 10567-73.
- Maurice JM, Gan Y, Ma FX, Chang YC, Hibner M, Huang Y. Bupivacaine causes cytotoxicity in mouse C2C12 myoblast cells: involvement of ERK and Akt signaling pathways. *Acta Pharmacol Sin* 31:493–500, 2010
- McCord, J. M. & Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*, 244, 6049-55.
- McCord, J. M., Keele, B. B. & Fridovich, Y. 1974. An enzyme based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 41, 35-97.
- Morey-Holton, E. R. & Globus, R. K. 2002. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol*, 92, 1367-77.
- Murrell, G. A. & Rapeport, W. G. 1986. Clinical pharmacokinetics of allopurinol. *Clin Pharmacokinet*, 11, 343-53.
- Nakama K, Gotoh M, Yamada T, Mitsui Y, Yasukawa H,

- Imaizumi T, Higuchi F, Nagata K. Interleukin-6-induced activation of signal transducer and activator of transcription-3 in ruptured rotator cuff tendon. *J Int Med Res* 34: 624–631, 2006
- Nisoli, E., Clementi, E., Paolucci, C., Cozzi, V., Tonello, C., Sciorati, C., Bracale, R., Valerio, A., Francolini, M., Moncada, S. & Carruba, M. O. 2003. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*, 299, 896-9.
- Okamoto, H. 1985. Molecular basis of experimental diabetes degeneration, oncogenesis and regeneration of pancreatic b-cells os islets of Langerhans. *Bioassays* 2: 15-21.
- Orlander, J., Kiessling, K. H., Larsson, L., Karlsson, J. & Aniansson, A. 1978. Skeletal muscle metabolism and ultrastructure in relation to age in sedentary men. *Acta Physiol Scand*, 104, 249-61.
- O'Rourke KS, Blaivas M, Ike RW. Utility of needle muscle biopsy in a university rheumatology practice. *J Rheumatol*. Mar;21(3):413-24.
- Pacifici, R. E. & Davies, K. J. 1991. Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free- radical theory of aging revisited. *Gerontology*, 37, 166-80.
- Paddon-Jones, D., Sheffield-Moore, M., Urban, R. J., Sanford, A. P., Aarsland, A., Wolfe, R. R. & Ferrando, A. A. 2004. Essential amino acid and carbohydrate supplementation ameliorates muscle protein loss in humans during 28 days bedrest. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 4351-8.
- Parks, D. A. & Granger, D. N. 1986. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand Suppl*, 548, 87-99.
- Pilegaard H, Birk JB, Sacchetti M, Mourtzakis M, Hardie DG, Stewart G, Neuffer PD, Saltin B, van Hall G, Wojtaszewski JF. PDH-E1alpha dephosphorylation and activation in human skeletal muscle during exercise: effect of intralipid infusion. *Diabetes* 55: 3020–3027,2006.
- Powers, S. K., Kavazis, A. N. & DeRuisseau, K. C. 2005.

- Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288, R337-44.
- Primeau, A. J., Adhihetty, P. J. & Hood, D. A. 2002. Apoptosis in heart and skeletal muscle. *Can J Appl Physiol*, 27, 349-95.
- Purintrapiban, J., Wang, M. C. & Forsberg, N. E. 2003. Degradation of sarcomeric and cytoskeletal proteins in cultured skeletal muscle cells. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 136, 393-401.
- Reid, M. B. & Li, Y. P. 2001a. Cytokines and oxidative signalling in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*, 171, 225-32.
- Rosenberg, I. H. 1997. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *J Nutr*, 127, 990S-991S.
- Sanchis-Gomar, F. et al. Allopurinol prevents cardiac and skeletal muscle damage in professional soccer players. *Scand J Med SciSports* 25, e110–115 (2015).
- Sastre, J., Asensi, M., Gasco, E., Pallardo, F. V., Ferrero, J. A., Furukawa, T. & Vina, J. 1992. Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol*, 263, R992-5.
- Schardinger 1902. Z. Untersuch. Genussmittel. 5: 1113-1121. Sen, C. K. M., E.; Kretzschmar, M.; Hañnninen, O. 1992. Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise, and immobilization. *J. Appl.Physiol.*, 73, 1265–1272.
- Schulze, K., Gallagher, P. & Trappe, S. Resistance training preserves skeletal muscle function during unloading in humans. *Med SciSports Exerc* 34, 303–313 2002
- Servais, S., Letexier, D., Favier, R., Duchamp, C. & Desplanches, D. 2007. Prevention of unloading-induced atrophy by vitamin E supplementation: links between oxidative stress and soleus muscle proteolysis? *Free Radic Biol Med*, 42, 627-35.
- Sies, H. 1983. Biochemistry of oxidative stress.

- Glutathione: storage, transport and turnover in mammals. S. Y., T. Higashi and N. Tateishi, Japan Scientific Press, Tokyo and UNU. Science Press, Utrech.: 63-69.
- Sies, H. 1985. Oxidative Stress. London: Academic.
- Sies, H. 1986. Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem.*, 25, 1058-1071.
- Slade R, C. K. e. a. 1983. Comparison of antioxidant substances in brochoalveolar lavage cells and fluid from humans, guinea pigs, and rats. *Exp. Lung Res.*, 19, 469-484.
- Slater, T. F. 1984. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J*, 222, 1-15.
- Sommerburg, O., Grune, T., Hampl, H., Riedel, E., van Kuijk, F. J., Ehrich, J. H. & Siems, W. G. 1998. Does long-term treatment of renal anaemia with recombinant erythropoietin influence oxidative stress in haemodialysed patients? *Nephrol Dial Transplant*, 13, 2583-7.
- Springer, J. et al. Inhibition of xanthine oxidase reduces wasting and improves outcome in a rat model of cancer cachexia. *Int JCancer* 131, 2187–2196 (2012).
- St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J. & Brand, M. D. 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem*, 277, 44784-90.
- Stadman, E. R. 1992. Protein oxidation and aging. *Science*, 257, 1220-1224.
- Stamler, J. S. & Meissner, G. 2001. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev*, 81, 209-237.
- Takada, A., J. Neil, et al. 1982. Clinicopathological study of alcoholicfibrosis. *American Journal of Gastroenterology.*, 77, 660-666.
- Thomason, D. B., Biggs, R. B. & Booth, F. W. 1989. Protein metabolism and beta-myosin heavy-chain mRNA in unweighted soleus muscle. *Am J Physiol*, 257, R300-5.
- Thomason, D. B. & Booth, F. W. 1990b. Atrophy of the

- soleus muscle by hindlimb unweighting. *J Appl Physiol*, 68, 1-12.
- Williams, D., Kuipers, A., Mukai, C. & Thirsk, R. 2009. Acclimation during space flight: effects on human physiology. *CMAJ*, 180, 1317-23.
- Wolf SP, G. A. e. a. 1986. Free radicals, lipids and protein degeneration. *Trends Bioch. Sci.*, 11, 27-31.
- Young, A. & Skelton, D. A. 1994. Applied physiology of strength and power in old age. *Int J Sports Med*, 15, 149-51.

8.- ANEXOS

Glucose 6-P dehydrogenase delays the onset of frailty by protecting against muscle damage

Coralie Arc-Chagnaud^{1†}, Andrea Salvador-Pascual^{1,2†}, Esther Garcia-Dominguez¹, Gloria Olaso-Gonzalez^{1*}, Angela G. Correas¹, Eva Serna¹, Thomas Brioché³, Angele Chopard³, Pablo J. Fernandez-Marcos⁴, Manuel Serrano^{5,6}, Antonio L. Serrano⁷, Pura Muñoz-Cánoves^{5,7,8}, Vicente Sebastián⁹, Jose Viña¹⁰ & Mari Carmen Gomez-Cabrera¹¹

¹Freshage Research Group, Department of Physiology, School of Medicine, University of Valencia, CIBERFES, Fundación Investigación Hospital Clínica Universitaria/INCLIVA, Valencia, Spain; ²Department of Integrative Biology, University of California, Berkeley, CA, USA; ³INRAE, UMR866 Dynamique Musculaire et Métabolisme, Université de Montpellier, Montpellier, France; ⁴Metabolic Syndrome Group - BIOPROMET, Madrid Institute for Advanced Studies - IMDEA Food, CEI UAM+CSIC, Madrid, Spain; ⁵Catalan Institution for Research and Advanced Studies (ICREA), Barcelona, Spain; ⁶Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), Barcelona Institute of Science and Technology (BIST), Barcelona, Spain; ⁷Department of Experimental and Health Sciences, University Pompeu Fabra and CIBERNED, Barcelona, Spain; ⁸Spanish National Center on Cardiovascular Research (CNIC), Madrid, Spain; ⁹Clinica Ypsilon de medicina física y rehabilitación, Valencia, Spain

Abstract

Background Frailty is a major age-associated syndrome leading to disability. Oxidative damage plays a significant role in the promotion of frailty. The cellular antioxidant system relies on reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) that is highly dependent on glucose 6-P dehydrogenase (G6PD). The G6PD-overexpressing mouse (G6PD-Tg) is protected against metabolic stresses. Our aim was to examine whether this protection delays frailty.

Methods Old wild-type (WT) and G6PD-Tg mice were evaluated longitudinally in terms of frailty. Indirect calorimetry, transcriptomic profile, and different skeletal muscle quality markers and muscle regenerative capacity were also investigated.

Results The percentage of frail mice was significantly lower in the G6PD-Tg than in the WT genotype, especially in 26-month-old mice where 50% of the WT were frail vs. only 13% of the Tg ones ($P < 0.001$). Skeletal muscle transcriptomic analysis showed an up-regulation of respiratory chain and oxidative phosphorylation ($P = 0.009$) as well as glutathione metabolism ($P = 0.035$) pathways in the G6PD-Tg mice. Accordingly, the Tg animals exhibited an increase in reduced glutathione (34.5%, $P < 0.01$) and a decrease on its oxidized form (−69%, $P < 0.05$) and in lipid peroxidation (4-HNE: −20.5%, $P < 0.05$). The G6PD-Tg mice also showed reduced apoptosis (BAX/Bcl2: −25.5%, $P < 0.05$; and Bcl-xL: −20.5%, $P < 0.05$), lower levels of the intramuscular adipocyte marker FABP4 (−54.7%, $P < 0.05$), and increased markers of mitochondrial content (COX IV: 89.7%, $P < 0.05$; Grp75: 37.8%, $P < 0.05$) and mitochondrial OXPHOS complexes (CII: 81.25%, $P < 0.01$; CIII: 52.5%, $P < 0.01$; and CV: 37.2%, $P < 0.05$). Energy expenditure (−4.29%, $P < 0.001$) and the respiratory exchange ratio were lower (−13.4%, $P < 0.0001$) while the locomotor activity was higher (43.4%, $P < 0.0001$) in the 20-month-old Tg, indicating a major energetic advantage in these mice. Short-term exercise training in young C57BL/6J mice induced a robust activation of G6PD in skeletal muscle (203.4%, $P < 0.05$), similar to that achieved in the G6PD-Tg mice (142.3%, $P < 0.01$).

Conclusions Glucose 6-P dehydrogenase deficiency can be an underestimated risk factor for several human pathologies and even frailty. By overexpressing G6PD, we provide the first molecular model of robustness. Because G6PD is regulated by pharmacological and physiological interventions like exercise, our results provide molecular bases for interventions that by increasing G6PD will delay the onset of frailty.

Keywords Aging; Antioxidant; Mitochondria; Disability; Healthspan; NADPH; Reactive oxygen species

Received: 29 September 2020; Revised: 26 July 2021; Accepted: 23 August 2021

*Correspondence to: Gloria Olaso-Gonzalez, Department of Physiology, School of Medicine, University of Valencia, Av. Blasco Ibañez 15, 46010 Valencia, Spain. Phone: +34963983266, Email: gloria.olaso@uv.es

†These two authors have contributed equally to the work.

‡These two authors have contributed equally as senior authors of this work.

OPEN

Allopurinol partially prevents disuse muscle atrophy in mice and humans

Received: 25 May 2017
Accepted: 7 February 2018
Published online: 23 February 2018

Beatriz Ferrando^{1,2}, Mari Carmen Gomez-Cabrera³, Andrea Salvador-Pascual², Carlos Puchades³, Frederic Derbré⁴, Arlette Gratas-Delamarche⁴, Ludovic Laparre⁴, Gloria Olaso-Gonzalez², Miguel Cerda⁵, Enrique Viosca⁶, Ana Alabajos⁶, Vicente Sebastián⁷, Angel Alberich-Bayarri^{8,9}, Fabio Garcia-Castro⁹ & Jose Viña²

Disuse muscle wasting will likely affect everyone in his or her lifetime in response to pathologies such as joint immobilization, inactivity or bed rest. There are no good therapies to treat it. We previously found that allopurinol, a drug widely used to treat gout, protects muscle damage after exhaustive exercise and results in functional gains in old individuals. Thus, we decided to test its effect in the prevention of soleus muscle atrophy after two weeks of hindlimb unloading in mice, and lower leg immobilization following ankle sprain in humans (EudraCT: 2011-003541-17). Our results show that allopurinol partially protects against muscle atrophy in both mice and humans. The protective effect of allopurinol is similar to that of resistance exercise which is the best-known way to prevent muscle mass loss in disuse human models. We report that allopurinol protects against the loss of muscle mass by inhibiting the expression of ubiquitin ligases. Our results suggest that the ubiquitin-proteasome pathway is an appropriate therapeutic target to inhibit muscle wasting and emphasizes the role of allopurinol as a non-hormonal intervention to treat disuse muscle atrophy.

Muscle atrophy occurs when protein degradation rates exceed protein synthesis and may take place in adult skeletal muscle in a variety of conditions, including denervation, cancer, sepsis, heart failure, aging, bed rest, immobilization, and inactivity¹. Research into muscle atrophy is of high clinical relevance because the treatment of many diseases involves a reduction in physical activity and in some cases restriction of movement of patients².

Disuse promotes atrophy of skeletal muscle by stimulating protein breakdown³. This process involves the activation of the ubiquitin-proteasome pathway². This pathway includes two critical muscle-specific ubiquitin ligases: muscle RING finger 1 (MuRF-1) and muscle atrophy F-box (MAFbx)^{4,5}. They regulate the degradation of skeletal muscle proteins such as calcineurin, myoD, troponin-1, titin, and myosin heavy and light chains^{6,7}. The ubiquitin-proteasome system is required to remove sarcomeric proteins due to changes in muscle activity. It is constitutively operative in normal skeletal muscle and is responsible for the turnover of most soluble and myofibrillar muscle proteins⁸. The activity of this pathway is markedly increased in atrophying muscle due to transcriptional activation of ubiquitin, of several proteasomal subunit genes, and of MAFbx and MuRF-1⁴. Importantly, the rate of muscle atrophy is markedly reduced by targeted inactivation of these gene products⁹. Another important ubiquitin ligase involved in skeletal muscle atrophy is Casitas B-lineage lymphoma b (Cbl-b)^{10,11}. Upon induction, Cbl-b interacts with, and degrades, the IGF-1 signaling intermediate insulin receptor substrate-1 (IRS-1). IRS-1 is a docking protein for several signaling intermediates including p85, the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K). PI-3K activation leads to phospholipid generation in the plasma membrane, which

¹Danish Center for Molecular Gerontology and Danish Aging Research Center, Department of Molecular Biology and Genetics, Aarhus University, Aarhus, Denmark. ²Freshage Research Group, Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Valencia and CIBERFES, Fundación Investigación Hospital Clínico Universitario/INCLIVA, Valencia, Spain. ³Servicio de Oncología Médica, Hospital La Fe, Valencia, Spain. ⁴Laboratory of Movement Sport and Health Sciences (M2S), University Rennes 2-ENS, Rennes, France. ⁵Department of Pathology, University of Valencia, Valencia, Spain. ⁶Servicio de Medicina Física y Rehabilitación, Hospital La Fe, Valencia, Spain. ⁷Clinica Ypsilon de medicina física y rehabilitación, Valencia, Spain. ⁸GIBI 230 (Biomedical Imaging Research Group), La Fe Health Research Institute, Valencia, Spain. ⁹QUIBIM SL, Valencia, Spain. Beatriz Ferrando and Mari Carmen Gomez-Cabrera contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.C.G.-C. (email: carmen.gomez@uv.es)



REVISIÓN

Alopurinol y su papel en el tratamiento de la sarcopenia



Beatriz Ferrando^a, Gloria Olaso-Gonzalez^a, Vicente Sebastia^b, Enrique Viosca^b,
Mari Carmen Gomez-Cabrera^a y Jose Viña^{a,*}

^a Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Fundación Investigación Hospital Clínico Universitario/INCLIVA, Valencia, España

^b Servicio de Medicina Física y Rehabilitación, Hospital La Fe, Valencia, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 6 de marzo de 2014

Aceptado el 5 de mayo de 2014

On-line el 15 de agosto de 2014

Palabras clave:

Xantina oxidasa

Estrés oxidativo

E3 ubiquitinligasas

Músculo esquelético

Atrofia

Keywords:

Xanthine oxidase

Oxidative stress

E3 ubiquitin ligases

Skeletal muscle

Atrophy

RESUMEN

La xantina oxidasa (XO) es la enzima que cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y de esta a ácido úrico, por lo que desempeña un importante papel en el catabolismo de las purinas. El alopurinol, un análogo de las purinas, es un conocido inhibidor de la XO ampliamente utilizado en la práctica clínica para el tratamiento de la gota.

Estudios recientes indican que el alopurinol reduce el estrés oxidativo y mejora la función vascular en diversas enfermedades cardiometabólicas, aumenta el tiempo de ejercicio en pacientes con angina de pecho y mejora la eficiencia de la contractilidad miocárdica en la insuficiencia cardíaca. La XO también ejerce un papel importante en la generación de radicales libres durante la contracción muscular, y por tanto se ha relacionado con el daño muscular asociado al ejercicio físico agotador. Diversos grupos de investigación han demostrado el efecto protector del alopurinol en la prevención de este tipo de daño.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este trabajo nos hemos planteado revisar el posible papel del alopurinol en el tratamiento de la sarcopenia, un síndrome geriátrico caracterizado por la progresiva y generalizada pérdida de masa y fuerza muscular, que supone un aumento del riesgo de discapacidad, baja calidad de vida y muerte.

© 2014 SEGG. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Allopurinol and its role in the treatment of sarcopenia

ABSTRACT

Xanthine oxidase (XO) is an enzyme that catalyzes the oxidation of hypoxanthine to xanthine and uric acid and plays an important role in purine catabolism. The purine analogue, allopurinol, is a well-known inhibitor of XO widely used in the clinical management of gout and conditions associated with hyperuricemia. More recent data indicate that allopurinol reduces oxidative stress and improves vascular function in several cardiometabolic diseases, prolongs exercise time in angina, and improves the efficiency of cardiac contractility in heart failure. XO also plays an important role in free radical generation during skeletal muscle contraction and thus, it has been related to the muscle damage associated to exhaustive exercise. Several research groups have shown the protective effect of allopurinol in the prevention of this type of damage.

Based on this background, a critical overview is presented on the possible role of allopurinol in the treatment of sarcopenia, a geriatric syndrome characterized by progressive and generalized loss of skeletal muscle mass and strength with a risk of adverse outcomes, such as physical disability, poor quality of life and death.

© 2014 SEGG. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Antecedentes históricos del alopurinol

El alopurinol (1,5-dihidro-4H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona) es un análogo estructural de la base púrica hipoxantina y actúa como un inhibidor de la xantina oxidasa (XO), la enzima

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jose.vina@uv.es (J. Viña).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.regg.2014.05.001>

0211-139X/© 2014 SEGG. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Repeated muscle biopsies through a single skin incision do not elicit muscle signaling, but IL-6 mRNA and STAT3 phosphorylation increase in injured muscle

Borja Guerra,¹ M. Carmen Gómez-Cabrera,² Jesús Gustavo Ponce-González,¹ Vladimir E. Martínez-Bello,² Amelia Guadalupe-Grau, Alfredo Santana,^{1,3,4} Vicente Sebastia,⁵ Jose Viña,² and José A. L. Calbet¹

¹Department of Physical Education, University of Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria; ²Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Valencia, Fundación Investigación Hospital Clínico Universitario/INCLIVA, Valencia; ³Genetic Unit, Childhood Hospital-Materno Infantil de Las Palmas, ⁴Research Unit, Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria; and ⁵Department of Physical Medicine and Rehabilitation, Hospital La Fe, Valencia, Spain

Submitted 24 January 2011; accepted in final form 21 March 2011

Guerra B, Gómez-Cabrera MC, Ponce-González JG, Martínez-Bello VE, Guadalupe-Grau A, Santana A, Sebastia V, Viña J, Calbet JA. Repeated muscle biopsies through a single skin incision do not elicit muscle signaling, but IL-6 mRNA and STAT3 phosphorylation increase in injured muscle. *J Appl Physiol* 110: 1708–1715, 2011. First published March 24, 2011; doi:10.1152/jappphysiol.00091.2011.—To determine if muscle biopsies can be repeated using a single small (5–6 mm) skin incision without inducing immediate MAPK activation or inflammation in the noninjured areas, the phosphorylation of ERK1/2, p38-MAPK, c-Jun NH₂-terminal kinases (JNKs), I κ B α , IKK α , and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) was examined concurrent with IL-6 mRNA in six muscle biopsies obtained from the vastus lateralis of five men. Four biopsies were obtained through the same incision (5–6 mm) from the right leg (taken at 0, 30, 123, and 126 min) and another two each from new incisions performed in the left leg (at 31 and 120 min), while the subjects rested supine. The first three biopsies from the right leg were taken ~3 cm apart from prebiopsied areas. The last biopsy was obtained from the same point from which the second biopsy was sampled. The three biopsies performed through the same skin incision from noninjured muscle areas showed similar levels of ERK1/2, p38-MAPK, JNK, IKK α , I κ B α , and STAT3 phosphorylation and similar IL-6 mRNA content. There were no significant differences in the levels of ERK1/2, p38-MAPK, JNK, IKK α , and I κ B α phosphorylation between the mean of the three biopsies obtained from the same incision and the sixth biopsy obtained from an injured area. STAT3 phosphorylation was increased by ~3.5-fold in the sixth biopsy compared with the mean of the three biopsies obtained from the same incision ($P < 0.05$), and IL-6 mRNA content was increased by 1.8-fold ($P < 0.05$). In summary, repeated muscle biopsies can be performed through a single 5- to 6-mm skin incision without eliciting muscle signaling through cascades responding to cellular stress, inflammation, or muscle damage. STAT3 phosphorylation is an early event in the healing response to muscle injury, probably mediated by the autocrine production of IL-6.

signal transducer and activator of transcription; interleukin-6; inflammation

REPEATED PERCUTANEOUS NEEDLE muscle biopsies are often performed in human studies (20, 26–27, 35). Since the publication by Aronson et al. (3) showing that extracellular-regulated

protein kinase cascades are activated in response to injury in human skeletal muscle, performance of repeated biopsies using new incisions each time has been advised. Despite using new incisions, Malm et al. (22) reported that repeated muscle biopsies (over 7 days) elicited blood immunological and muscle immunohistochemical changes similar to those observed after 30 min of eccentric exercise in humans. Some of the immunohistochemical changes (IL-1 α and IL-1 β) were already present 30 min after the first biopsy. Malm (21) hypothesized that repeated muscle biopsies may evoke humoral and immune responses which may affect the musculature. However, in a recent study by Drummond et al. (6) where two biopsies were taken from the same incision 60 min apart, one directed cranially and the other caudally, no phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1 and 2 (ERK1/2) was observed. In agreement with Drummond et al. (6), we did not find significant differences in p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) phosphorylation in three consecutive biopsies that were obtained from the same incision (separated by 90 and 210 min) but directing the biopsy needle to muscle areas ~3 cm apart from previously biopsied sites (10).

It is a common practice in some exercise physiology experiments to perform an incision before starting exercise to obtain the muscle biopsy 30 min later. The incision is performed prior starting exercise to allow a fast muscle sampling at the target time. However, it remains unknown if the time elapsed from the cutaneous incision to the biopsy instant may also induce some stress-related kinases in the skeletal muscle. There may be some degree of inflammation in the injured skin 30–90 min after the incision, and perhaps introducing the biopsy needle through this skin area could induce activation of some inflammatory cascades in the muscle sampled from a muscle region free of injury. On the other hand, by making a new incision each time a biopsy is performed the surgical aggression and the risks of causing side effects (12) or eliciting muscle immunohistochemical changes (22) are increased. In fact, in the study by Malm et al. (22), seven forceps biopsies with 1.5-cm long skin incisions were performed, i.e., the total amount of skin cut was 10.5 cm. With a smaller surgical aggression, no activation of extracellular-regulated protein kinases was observed when the biopsies were obtained from a new incision 5 cm apart from the previous one (3). It remains unknown whether repeated muscle biopsies with small incisions (5–6 mm) may trigger a

Address for reprint requests and other correspondence: J. A. L. Calbet, Departamento de Educación Física, Campus Universitario de Tafira, 35017 Las Palmas de Gran Canaria, Canary Island, Spain (e-mail: lopezcalbet@gmail.com).

1708

8750-7587/11 Copyright © 2011 the American Physiological Society

http://www.jap.org

Downloaded from www.physiology.org/journal/jappphysiol by \${individualUser.givenNames} \${individualUser.surname} (084.121.214.245) on October 18, 2018.
Copyright © 2011 American Physiological Society. All rights reserved.