





FUNCIÓN MUSCULAR PERIFÉRICA  
Y ENTRENAMIENTO FÍSICO EN  
LA ENFERMEDAD PULMONAR  
OBSTRUCTIVA CRÓNICA

RELACIONES ENTRE ESTADO REDOX,  
INFLAMACIÓN Y RESPIRACIÓN  
MITOCONDRIAL



Roberto Alejandro Rabinovich

FUNCIÓN MUSCULAR PERIFÉRICA  
Y ENTRENAMIENTO FÍSICO EN  
LA ENFERMEDAD PULMONAR  
OBSTRUCTIVA CRÓNICA

RELACIONES ENTRE ESTADO REDOX,  
INFLAMACIÓN Y RESPIRACIÓN  
MITOCONDRIAL

Tesis Doctoral



**Universitat de Barcelona**

Departament de Medicina | Programa de Biopatología en Medicina

ROBERTO ALEJANDRO RABINOVICH  
Licenciado en Medicina y Cirugía  
Universidad de Buenos Aires

Especialista en Medicina Interna  
Universidad de Buenos Aires

Especialista en Cuidados Intensivos  
Pontificia Universidad Católica de Buenos Aires

Alumno del programa de Biopatología en Medicina  
Departament de Medicina | Universitat de Barcelona  
Bienio 2000-2002

Directores de Tesis:

JOSEP ROCA  
Profesor Titular  
Departament de Medicina, Universitat de Barcelona. IDIBAPS  
Consultor Senior  
Servei de Pneumologia i Al·lèrgia Respiratòria  
Institut Clínic del Tòrax  
Hospital Clínic de Barcelona

JOSÉ CARLOS FERNANDEZ-CHECA  
Investigador del CSIC  
Departamento de Hepatología, Universitat de Barcelona  
Facultat de Medicina, IDIBAPS

© 2005 Roberto A. Rabinovich

# Agradecimientos

A mis directores de tesis el Dr. J. Roca y J.C. Fernandez-Checa por haberme aportado su inestimable ayuda y su experiencia en forma desinteresada desde el comienzo de este largo proceso.

A los doctores J.A. Barberà y R. Rodríguez-Roisin por su contribución a la generación de un espacio en el cual he podido desarrollarme como profesional e investigador.

A todos los técnicos y personal administrativo del Laboratorio de Función Pulmonar en especial a Mirjam Hillenius, Felip Burgos y Conchi Gistau y sin los cuales no hubiese sido posible llevar a cabo este proyecto.

A todos aquellos que han hecho posible el desarrollo de la presente tesis doctoral: Carmen Hernández, Dra. Neus Carbó, Maite Figueras Polo, Dr. JM Argilés, Dr. JM Gonzalez de Suso, Dr. Juli Alonso, Dr. X Filella, Anna Capitán, Cristina Gonzalez, Eduard Vilar, Pau Vilella, Elena Gimeno, Nestor Sanchez, Dr. Mauricio Orozco-Levi, Dr. Joaquim Gea Guiral; y AM Mayer.

A todos los compañeros con quienes he compartido estos años de trabajo en el Laboratorio de Funcionalismo pulmonar, Paolo Onorati, Agustín Acuña, Loli Uribe, Jasmina Gabrijelcic, Marco Manzini y en especial a Thierry Troosters por todo lo que me ha enseñado durante el año que compartimos en el laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio de básicas, Raquel París, Víctor Peinado y en especial a Ricardo Bastos por haberme enseñado y guiado por el difícil camino de la investigación básica con una generosidad poco común y que siempre voy a agradecer; y a Esther Ardite por su ayuda y guía dentro del laboratorio, un ambiente que me era ajeno al comienzo de este trabajo.

A Jordi Vilaró por ser mi compañero de equipo durante todo este proceso y principal sostén del programa de rehabilitación.

Al Dr. Salvador Benito por haberme brindado su amistad y apoyo en todos estos años.

A mi profesor y guía el Dr. Aquiles Roncoroni, por darme su confianza, por su afecto, por el honor de considerarme su discípulo, por su constante incentivo, por haberme abierto caminos desinteresadamente, por mostrarme que nunca se debe renunciar a aprender, por haber sabido sacar lo mejor de mí y por demostrarme que hay gente que nunca envejece.

A Silvia Quadrelli, por ser Silvia Quadrelli, por su entrega, por su afecto, por su consejo, por su guía, por su apoyo, por ser diferente.

A mi familia, que me acompaña a pesar de la distancia.





# Presentación

La presentación de esta tesis doctoral se realiza en forma de compendio de artículos publicados según la normativa aprobada por la Comisión de Doctorado de la Universidad de Barcelona. En la introducción se revisan aspectos esenciales de la disfunción muscular en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), con el objetivo de justificar las hipótesis de trabajo de la tesis. Se analiza la estructura-función muscular normal y las anomalías descritas en pacientes con EPOC. También se revisan los mecanismos responsables de dichas alteraciones que han sido identificados hasta estos momentos. El núcleo de la tesis lo constituyen cuatro artículos originales en los que el doctorando es el primer autor. Dos de ellos publicados en revistas internacionales con un alto factor de impacto en Neumología. Los restantes enviados para su publicación en revistas internacionales. Tres de dichos artículos se centran en el estudio del estado redox celular en el músculo esquelético periférico de pacientes con EPOC y en sujetos sanos. Analizan las asociaciones entre alteraciones redox musculares y la pérdida de masa muscular. Se estudia la función mitocondrial en el músculo esquelético de estos pacientes con énfasis en la ineficiencia de la fosforilación oxidativa y su implicación fisiopatológica en la pérdida de masa muscular. En estos estudios, también se ha explorado la expresión diferencial a nivel muscular de diversos genes relacionados con la fisiopatología de la pérdida de masa muscular en la EPOC, entre ellos, genes moduladores de algunas citocinas y otros relacionados con los mecanismos de síntesis y metabolismo del glutatión. El artículo restante estudia los efectos que el ejercicio agudo y el entrenamiento físico tienen sobre la expresión génica del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) a nivel

muscular y sobre las concentraciones plasmáticas de TNF $\alpha$  e Interleucina-6 (IL-6). Este trabajo representa un primer análisis de las interacciones entre vías inflamatorias y alteraciones en el estado redox celular. En el anexo de la presente tesis se incluyen la editorial realizada por el Dr. Michael Reid que acompañó al primer artículo de la tesis, publicado en el *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, así como una carta al editor del Dr. Peter Wagner también en relación a dicho artículo. Considero que ambos materiales ayudan a contextualizar el tema de la presente tesis en el debate existente sobre la afectación sistémica de la EPOC.



# Introducción

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) se caracteriza por la obstrucción crónica al flujo aéreo solo parcialmente reversible con la administración de broncodilatadores y que se debe a la combinación de patología de la vía aérea y a la destrucción del parénquima pulmonar<sup>1</sup> reconociendo como factor causal fundamental el tabaquismo.

La EPOC afecta a más de 52 millones de personas en todo el mundo y causó más de 2,74 millones de muertes en el año 2000<sup>2</sup>. En los países desarrollados es la cuarta causa de muerte<sup>2,3</sup> y, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se espera que su impacto global sobre la salud se duplique en el período comprendido entre 1990 y 2020.

La EPOC es una enfermedad crónica de progresión lenta cuyos síntomas capitales son la intolerancia al ejercicio y la disnea que lo acompaña pudiendo ésta presentarse, en etapas avanzadas de la enfermedad, incluso en reposo.

El concepto clásico de que la intolerancia al ejercicio se debe exclusivamente a la disnea ocasionada por el aumento del trabajo respiratorio ha sido cuestionado durante la última década, desde que se demostrara que un número importante de pacientes detienen el ejercicio debido a molestias en las extremidades inferiores y no debido a disnea<sup>4</sup>. Si bien los pacientes con EPOC presentan alteraciones en la mecánica pulmonar, y frecuentemente en el intercambio de gases, que pueden condicionar intolerancia al ejercicio antes de que el músculo esquelético alcance su límite de funcionalidad, se ha demostrado la existencia de una disfunción muscular periférica que contribuye de manera sustancial a reducir la tolerancia al ejercicio<sup>5,6</sup>, clásicamente

atribuida únicamente a factores pulmonares<sup>7</sup>. Algunos estudios incluso refieren que la intolerancia al ejercicio en la EPOC tiene una mejor correlación con la masa/función muscular de miembros inferiores que con el grado de obstrucción bronquial<sup>8;9</sup>. Se ha descrito que pacientes con EPOC con una función pulmonar comparable, pueden presentar diferentes niveles de tolerancia al ejercicio<sup>10</sup>. El impacto de la disfunción muscular en la EPOC no solo es importante por el condicionamiento de la tolerancia al ejercicio, sino que es también un factor asociado a una mayor utilización de recursos sanitarios<sup>11</sup>. La pérdida de masa muscular es un predictor de mortalidad independiente del grado de obstrucción al flujo aereo<sup>12-14</sup>. Por todo esto la EPOC debe ser reconocida como una enfermedad sistémica<sup>15</sup> y, en este sentido, la estadificación de esta enfermedad incorporando diferentes dominios de la misma (alteración de la capacidad ventilatoria, composición de la masa magra corporal, tolerancia al ejercicio y percepción de síntomas) permite predecir de manera más eficaz el curso evolutivo de estos pacientes que mediciones aisladas de función pulmonar en reposo, como el FEV<sub>1</sub><sup>16</sup>. La tolerancia al ejercicio en el paciente con EPOC, sin complicaciones cardiovasculares, debe ser analizada como un fenómeno modulado tanto por factores pulmonares como periféricos (musculares). Su medición contribuye, por tanto, a una evaluación de la severidad de la enfermedad más integral que la sola medición del funcionalismo pulmonar en reposo.

Se ha mencionado que la pérdida de peso corporal, presente en aproximadamente un 20% de los pacientes<sup>17</sup>, constituye un importante predictor de mortalidad<sup>12-14</sup>. Dicha pérdida de peso corporal es debida fundamentalmente a una disminución de la masa libre de grasa (*fat free mass*, FFM)<sup>18;19</sup>, aunque el fenómeno de depleción de la FFM puede observarse también en pacientes con peso corporal preservado<sup>17;20;21</sup> debido a la concurrencia de fenómenos como la disminución de masa magra, aumento de grasa corporal y redistribución de ambas. En consecuencia, la FFM es una variable más adecuada que el BMI<sup>8</sup> para la descripción fenotípica de los pacientes con EPOC.

La FFM se relaciona de forma estrecha con la fuerza muscular en los pacientes con EPOC<sup>22</sup> y se correlaciona no solo con la tolerancia al ejercicio a nivel de ejercicio pico<sup>5;23</sup> sino también con parámetros de tolerancia al ejercicio a nivel de carga submáxima<sup>5</sup>.



# La Disfunción Muscular en la EPOC

Se identifican 3 propiedades fisiológicas principales cuya preservación permite la adecuada funcionalidad del músculo esquelético: fuerza (*muscle strength*), resistencia (*muscle endurance*) y fatigabilidad (*muscle fatigue*).

La *fuerza muscular* se define como la capacidad de generar una contracción muscular de intensidad adecuada ante un estímulo contráctil. Depende del número y tipo de unidades motoras reclutadas. La fuerza muscular se encuentra disminuida en aproximadamente el 20-30% de pacientes con EPOC moderado a severo<sup>23;24</sup> y en la mayoría de pacientes con enfermedad avanzada. Es importante destacar que la fuerza normalizada por la masa muscular no es diferente entre sujetos sanos y pacientes con EPOC<sup>23</sup>. Estos hechos indican que la disminución de la fuerza se debe a la pérdida cuantitativa de fibras musculares y no se asocia a anomalías intrínsecas funcionales en las fibras musculares de estos pacientes<sup>25</sup>.

La *fatiga muscular* se define como la disminución de la capacidad de las fibras musculares para mantener una determinada fuerza de contracción durante el ejercicio prolongado y que es reversible con el reposo. Existe una cierta equivalencia entre molestias percibidas en las extremidades inferiores durante el ejercicio en los pacientes con EPOC y el fenómeno de fatiga muscular<sup>4;26-29</sup>. Es interesante destacar que la fatiga objetivada en los músculos de las extremidades inferiores en pacientes con EPOC tras una prueba de ejercicio incremental, no se acompaña de fatiga diafragmática<sup>30</sup>.

Más aún, en aquellos pacientes que presentan fatiga muscular al finalizar una prueba de ejercicio incremental, la mejoría del FEV<sub>1</sub> tras la administración de broncodilatadores no mejora la tolerancia al ejercicio<sup>6</sup>.

Por otro lado, la fatiga de miembros inferiores mejora de forma significativa después de un programa de entrenamiento muscular<sup>31</sup>. Los factores que modulan la fatiga muscular son complejos, pero presentan elementos comunes con la preservación de la resistencia muscular.

La *resistencia muscular* se define como la capacidad de sostener una contracción frente a una carga de trabajo. Es altamente dependiente de la capacidad de transporte y consumo de oxígeno del organismo y se halla claramente alterada en los pacientes con EPOC<sup>32-34</sup>. Coronell y colaboradores<sup>34</sup> demostraron que la disminución de la resistencia muscular en la EPOC se acompaña de fatiga. Otro hallazgo importante de este estudio fue la presencia de una resistencia muscular reducida aun en el grupo de pacientes con enfermedad leve o moderada, indicando que este fenómeno tiene lugar incluso en etapas iniciales de la enfermedad. La resistencia muscular se halla íntimamente relacionada con la integridad de las funciones musculares de producción aeróbica de energía y su integración funcional con el aparato contráctil del músculo. Ello explica la mejoría de la resistencia (y de la tolerancia al ejercicio) asociada al entrenamiento muscular<sup>31</sup>.

Se han descrito una variedad de factores que pueden limitar la resistencia muscular e incrementar el fenómeno de fatiga. Podemos citar, entre otros, la acumulación de protones derivados del metabolismo glicolítico a partir de la producción de ácido láctico<sup>35</sup>, concentraciones anormalmente elevadas de fósforo inorgánico derivado de la hidrólisis de ATP<sup>36</sup>, la elevación de los niveles intracelulares de magnesio derivado de la hidrólisis del MgATP<sup>37</sup> y la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS)<sup>38</sup>. Un inadecuado flujo sanguíneo a los músculos en actividad puede influenciar el desarrollo de fatiga muscular. La preservación del flujo sanguíneo adecuado en la microcirculación muscular es importante no solo para asegurar un transporte adecuado de oxígeno, sino que también es clave para la eliminación de metabolitos potencialmente involucrados en el desarrollo de fatiga muscular<sup>39</sup>.

## ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL MÚSCULO SANO

Las células que conforman el músculo adulto son en un 90 % fibras musculares diferenciadas. El otro 10 % corresponde a *células satélite* encargadas de la regeneración celular, necesaria para los procesos de crecimiento y reparación del daño muscular.

Durante un estímulo contráctil, la onda de despolarización generada a nivel de la placa neuromuscular de las fibras musculares que componen la unidad motora se propaga a través del retículo sarcoplásmico. Este es una compleja estructura tubular interconectada longitudinal y transversalmente, de forma que permite la expansión de la onda de despolarización desde la superficie celular al interior de la fibra muscular.

La unidad funcional contráctil de la fibra muscular es la sarcómera. A grandes rasgos, esta unidad funcional se compone de proteínas contráctiles como la miosina (aproximadamente 60 % de las proteínas), la actina y la tropomiosina. Cada una de estas proteínas cumple una función clave en la contracción muscular. Los filamentos de actina (filamentos finos) y miosina (filamentos gruesos) están involucrados primariamente en el proceso de contracción muscular, en el que tiene un papel central la liberación de calcio iónico ( $\text{Ca}^{++}$ ) desde el retículo sarcoplásmico. La liberación de  $\text{Ca}^{++}$  genera una serie de cambios de conformación en las miofibrillas que culmina cuando los puentes de los filamentos de miosina son atraídos a los sitios activos de la hélice de actina. El acortamiento se produce por acción de los puentes de miosina que se mueven permitiendo el deslizamiento de los filamentos de actina por sobre los de miosina. En este proceso se consume energía provista por la hidrólisis de adenosina trifosfato (ATP). Así, durante el proceso de contracción muscular, la energía química del ATP se transforma en energía mecánica. Cuando el músculo deja de ser estimulado, el flujo de  $\text{Ca}^{++}$  cesa, éste es nuevamente transportado al interior del retículo sarcoplásmico y se produce el desacoplamiento de los puentes de actina-miosina.

Aunque la célula contiene otros compuestos de alta energía, el ATP es el más importante. Con la hidrólisis de ATP, la concentración celular de adenosina di-fosfato (ADP) y fósforo inorgánico aumentan de forma proporcional. Este cambio estimula rápidamente la utilización de los depósitos de nutrientes y la respiración muscular para proveer energía necesaria para la re-síntesis de ATP, a partir de la utilización de lípidos y carbohidratos. La fosfocreatina (PCr) es también una molécula de depósito celular con un alto valor energético, que tiene un papel crucial en la transición entre el ejercicio de baja intensidad al de alta intensidad. No obstante, los depósitos de energía en forma de ATP y PCr son rápidamente consumidos de modo que, ante situaciones que suponen un continuo uso de energía, como la contracción muscular continuada que tiene lugar durante el ejercicio, los depósitos celulares de energía (ATP y PCr) son dependientes de la capacidad de resíntesis del sistema.

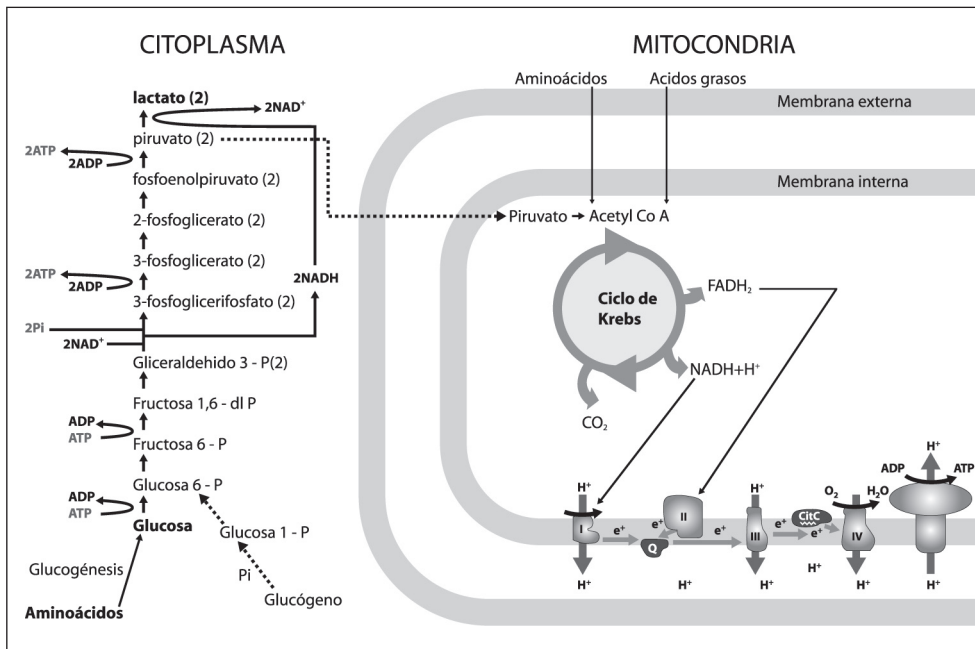
En el proceso de generación de energía celular la glucosa tiene un papel central como nutriente. La hidrólisis de la glucosa, presente en forma libre o formando polímeros de glucógeno en el interior de la célula muscular, es llevada a cabo por un número de reacciones enzimáticas, conocidas como glucólisis, que tienen lugar de forma secuencial en el citoplasma celular. En ausencia de oxígeno el producto final de la glucólisis es el ácido láctico, mientras que en presencia de oxígeno es el ácido pirúvico. Estas dos vías de un mismo proceso se denominan glucólisis anaeróbica y aeróbica, respectivamente.

El piruvato, no así el lactato, puede ser transferido al interior de la mitocondria, y una vez convertido en acetil coA, ingresa en el ciclo de los ácidos tri-carboxílicos (ciclo de Krebs) produciéndose dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), nicotinamida di-nucleótido reducido (NADH) y flavina adenina di-nucleótido reducido ( $\text{FADH}_2$ ). El NADH y  $\text{FADH}_2$  generados en este proceso catabólico de nutrientes celulares son moléculas ricas en energía puesto que contienen electrones transferibles, cuya liberación, genera un gran potencial energético a nivel de la cadena respiratoria ubicada en la membrana interna de la mitocondria. En este proceso, también conocido como fosforilación oxidativa, los electrones transportados por el NADH y  $\text{FADH}_2$  son transferidos a la coenzima Q por el complejo I y II de la cadena respiratoria mitocondrial respectivamente. Posteriormente, se transfieren a una serie de proteínas transportadoras de electrones que contienen hierro (Fe) denominadas citocromos. Con la aceptación de electrones, el Fe de los citocromos pasa a su forma reducida, y se forma NAD<sup>+</sup> y FAD que son reciclados para su posterior reutilización en el metabolismo energético. El último citocromo de la cadena respiratoria (*citocromo oxidasa*) transfiere sus electrones a un átomo de oxígeno. La oxidación se completa cuando un átomo de oxígeno con dos electrones libres se une a dos protones ( $\text{H}^+$ ) para formar una molécula de agua. Con la transferencia de un electrón a través de cada uno de los citocromos de la cadena se almacena un protón en el espacio comprendido entre las membranas interna y externa de la mitocondria generando un gradiente de protones entre el espacio inter-membrana y el interior de la mitocondria. Esta energía potencial se utiliza para la síntesis de ATP y, en último término, la re-síntesis de PCr, los dos principales depósitos energéticos celulares.

De esta forma, en condiciones anaeróbicas el producto final de la hidrólisis de la glucosa es el ácido láctico, mientras que en condiciones aeróbicas, la hidrólisis de la glucosa culmina con la formación de  $\text{CO}_2$ , agua y energía (ATP). La vía aeróbica



comprende, además de los procesos enzimáticos del ciclo de Krebs, la fosforilación oxidativa (**Figura 1**). Por cada molécula de glucosa hidrolizada en condiciones anaeróbicas se producen dos moléculas de ATP. Esto contrasta de forma dramática con las 36 moléculas de ATP que se producen por cada molécula de glucosa hidrolizada en condiciones aeróbicas. La glucólisis anaerobica debe analizarse como una vía vicariante para la generación celular de energía que tiene utilidad únicamente de forma transitoria. La descripción fisiológica efectuada nos indica la importancia del acoplamiento del transporte de oxígeno con el adecuado funcionalismo mitocondrial (fosforilación oxidativa) y los requerimientos energéticos celulares, especialmente durante el ejercicio sostenido.



**Figura 1. Esquema del metabolismo celular.** La producción de energía en forma de ATP comprende la utilización de nutrientes como ácidos grasos, aminoácidos e hidratos de carbono, fundamentalmente glucosa. La hidrólisis de la glucosa comprende una serie de reacciones metabólicas que tienen lugar en el citoplasma celular (glucólisis) y en la mitocondria. En presencia de oxígeno (glucólisis aeróbica) las reacciones que tienen lugar en el citoplasma tienen como producto final al piruvato, en ausencia del mismo (glucólisis anaeróbica), el producto final es el lactato. El piruvato puede translocarse al interior de la mitocondria y, una vez transformado en acetil CoA, ingresar al ciclo de Krebs dando como productos finales CO<sub>2</sub>, NADH + H<sup>+</sup> y FADH<sub>2</sub>. Estos últimos dan paso a la fosforilación oxidativa mitocondrial que culmina con la producción de ATP luego de una serie de reacciones químicas que involucran el paso de electrones a través de los diferentes complejos de la cadena respiratoria. El oxígeno molecular actúa como último aceptor de electrones en esta cadena de reacciones. La producción neta de ATP en condiciones aeróbicas constituye una vía metabólica altamente eficiente en comparación con la glucólisis anaeróbica con un balance de producción de ATP 18 veces mayor que esta última.

## CAMBIOS FISIOPATOLÓGICOS EN EL MÚSCULO PERIFÉRICO DEL PACIENTE CON EPOC

### Fibras musculares

El músculo esquelético humano se compone de dos tipos de fibras: lentas (tipo I) y rápidas (tipo IIa y IIx)<sup>40</sup>, de acuerdo a sus características contráctiles. Ambos tipos de fibras se distribuyen en proporción similar en el músculo adulto<sup>41</sup>. Su diversidad se basa fundamentalmente en la isoforma de la cadena pesada de miosina (del inglés *myosine heavy chain*, MHC) que contienen<sup>42</sup>. Las fibras tipo I son de contracción lenta, reclutadas a bajas frecuencias de estimulación, desarrollan una relativa baja tensión, tienen una gran capacidad oxidativa y son más resistentes a la fatiga. Las fibras rápidas tipo IIx son de contracción rápida, requieren una frecuencia de estimulación alta, desarrollan una gran tensión, dependen fundamentalmente de un metabolismo glicolítico y son más susceptibles a la fatiga. Las fibras rápidas tipo IIa poseen características intermedias entre las tipo I y las tipo IIx<sup>43-45</sup>. El músculo esquelético de mamíferos contiene además la isoforma IIb<sup>42</sup>. Debido a la dificultad para diferenciar las fibras IIx de las IIa y IIb mediante la reacción histoquímica de ATPasa, las fibras IIx han sido por largo tiempo confundidas con las IIb. Ha sido gracias a técnicas de inmunobloting que se ha clarificado la tipificación de las fibras musculares. Se ha demostrado la existencia de fibras IIx que contiene la isoforma IIx-MHC<sup>46-48</sup>, diferente de las IIa-MCH y IIb-MCH<sup>49</sup>. Así, las fibras antiguamente identificadas como tipo IIb en el músculo humano han sido reclasificadas como fibras tipo IIx<sup>47,48</sup>.

Existen también fibras híbridas que co-expresan diferentes tipos de MHC:  $\beta$ /MHC<sub>lenta</sub>+IIa-MHC (también conocidas como IIc), y IIa+IIx<sup>50-52</sup>. Estas representan un fenotipo de fibras en transformación<sup>53</sup> como las descritas en condiciones de inmovilización<sup>54</sup>, desuso<sup>55</sup> o como respuesta al entrenamiento físico<sup>56</sup>.

Los pacientes con EPOC presentan un aumento de la proporción fibras de tipo II en detrimento de las tipo I<sup>57-61;61-64</sup>. El incremento de fibras tipo II se caracteriza fundamentalmente por un aumento del número de fibras tipo IIx<sup>58;60;65;66</sup>. También ha sido descrita la presencia de fibras híbridas (I/IIa y IIa/IIx) en el músculo esquelético de pacientes con EPOC. Esto sugiere que la *transición* entre tipos de fibras puede ser el mecanismo que lleva a la redistribución de las mismas<sup>66</sup>.

En cuanto al tamaño de las fibras, las que presentan mayor grado de atrofia son las fibras tipo IIx y las híbridas IIa/IIx<sup>65</sup>. El predominio de atrofia de fibras tipo IIx parecería estar indicando que el desuso no sería la única causa de atrofia en este tipo de pacientes, puesto que esta situación se caracteriza inicialmente por atrofia de fibras tipo I<sup>67</sup>. Además, éste tipo de cambio en la redistribución de fibras ha sido descrito como consecuencia a hipoxia tisular continua o intermitente<sup>68</sup>. Más aún, en estados patológicos acompañados de un desequilibrio energético, como la anorexia nerviosa, se encuentra una atrofia predominantemente de fibras tipo II<sup>69</sup>. De esta manera, otros mecanismos fisiopatológicos serían necesarios como coadyuvantes al mero desuso para explicar las características de la atrofia en pacientes con EPOC. Cabe especular que los cambios en la distribución de los tipos de fibras en la EPOC pudieran ser la expresión de fenómenos de remodelación muscular generados por los mecanismos que determinan los efectos sistémicos de la enfermedad.

### **Alteraciones de la capilarización y del transporte de oxígeno muscular**

El transporte sistémico de oxígeno ( $QO_2$ ) depende de la presión parcial del gas ( $PaO_2$ ), la concentración y funcionalidad de la hemoglobina (Hb) y del flujo sanguíneo (Q). Para un determinado valor de  $QO_2$ , la oxigenación de las fibras musculares depende de dos factores principales. En primer lugar, del equilibrio funcional entre aporte de  $O_2$  a nivel de la microcirculación y la demanda tisular de  $O_2$ . El segundo factor importante para asegurar la difusión pasiva de  $O_2$  desde el capilar muscular a la mitocondria es la existencia de un área de transferencia adecuada (n° de capilares por fibra muscular) que permita vencer el gradiente de presión entre el hematíe y la pared externa del capilar<sup>70</sup>. Una vez dentro de la fibra muscular, el gradiente de  $PO_2$  es mínimo debido a que la mioglobina facilita la difusión de  $O_2$ . Existen datos sugestivos de que ambos factores: desequilibrio de las relaciones aporte-consumo de  $O_2$  a nivel de microcirculación muscular y la capilarización anormal del músculo<sup>71;72</sup> pueden constituir factores limitantes del aporte de oxígeno a la mitocondria en estos pacientes.

Para una determinada carga submáxima, el transporte sistémico de  $O_2$  en pacientes con EPOC no suele estar disminuído<sup>73</sup>, sino que incluso puede aparecer aumentado en relación a sujetos controles<sup>64;74</sup>. Ello podría ser indicativo de un aumento de las necesidades energéticas en relación a sujetos normales o bien de un transporte/utilización

muscular de  $O_2$  anómalo. En el primer supuesto, la indemnidad de los factores que determinan el transporte de  $O_2$  en el músculo (equilibrio de las relaciones  $QO_2$ - $VO_2$  (consumo de oxígeno) a nivel de la microcirculación y n° de capilares por fibra) sería clave para evitar la hipoxia tisular durante la actividad física. Desafortunadamente el análisis funcional de las relaciones  $QO_2$ - $VO_2$  en el músculo esquelético no es aún posible, aunque existen datos indirectos sugestivos de anormalidades a este nivel<sup>75;76</sup>.

Además de los factores descritos a nivel de transporte de oxígeno muscular, cabe señalar que los pacientes con EPOC avanzado pueden (en ausencia de patología del miocardio) presentar un incremento inadecuado del débito cardíaco y el aporte sistémico de oxígeno durante el ejercicio. Ello puede explicarse por el fenómeno de atropamiento aéreo. Asimismo, algunos pacientes con EPOC pueden presentar deterioro de la  $PaO_2$  durante el ejercicio que se traduciría en una alteración del aporte sistémico de oxígeno.

Estudios de microscopía electrónica<sup>77</sup> y óptica<sup>61</sup> demuestran un menor número de capilares por área en el músculo esquelético de miembros inferiores de pacientes con EPOC. El número de capilares por área mitocondrial también se encontró marcadamente disminuido<sup>77</sup>. De igual forma, el número de contactos entre capilares y fibras también está reducido de forma significativa en pacientes con EPOC<sup>58;61</sup>. Por el contrario, Richardson y colaboradores<sup>64</sup> no encontraron diferencias entre pacientes con EPOC y sujetos controles en lo que respecta a la densidad capilar (capilares por área) y al número de contactos de capilares con fibras musculares. Cabe señalar, que los pacientes con EPOC incluidos en este estudio<sup>64</sup> habían participado de un programa de rehabilitación de 8 a 24 meses de duración. Es bien conocido que el número de contacto capilar-fibra muscular se incrementa con el entrenamiento en pacientes con EPOC<sup>58</sup>. Esta disminución del número de contactos entre capilares y fibras puede contribuir a una reducción del transporte de oxígeno desde la circulación a la mitocondria fundamentalmente en situaciones de aumento de la demanda de oxígeno como ocurre durante el ejercicio.

### **Alteración de la bioenergética muscular**

Diversos estudios demuestran una disminución de la capacidad oxidativa del músculo esquelético periférico en pacientes con EPOC. Asimismo, el potencial energético celular (ATP y PCr) se encuentra disminuida en el músculo esquelético de

estos pacientes<sup>62;78</sup>. El tiempo medio de recuperación de Pcr al finalizar el ejercicio, un proceso eminentemente oxidativo, se encuentra prolongado en el músculo esquelético de pacientes con EPOC<sup>74</sup>.

También se observa la aparición de un incremento precoz de la producción de ácido láctico durante el ejercicio en estos pacientes<sup>73;79</sup> condicionando un umbral láctico temprano<sup>80</sup>. Este fenómeno no se explica por la actividad de los músculos respiratorios<sup>81</sup> sino por la de los músculos de las extremidades inferiores. A pesar de que los primeros (músculos respiratorios) trabajan contra una mayor resistencia y soportan una gran carga de trabajo, especialmente durante el ejercicio.

La acidosis por incremento precoz de los niveles de ácido láctico durante el ejercicio moderado genera un aumento de la demanda ventilatoria e induce la utilización de un patrón respiratorio basado en un aumento de la frecuencia respiratoria, que resulta poco favorable para el paciente por el incremento del atrapamiento aéreo. Este fenómeno, junto con la inducción de fatiga muscular por el incremento de la acidosis, constituyen factores importantes para explicar la menor tolerancia al ejercicio presentada por estos pacientes. De esta forma, la disminución del pH en la vena femoral durante el ejercicio sub-máximo se correlaciona con el consumo de oxígeno ( $\text{VO}_2$ ) pico<sup>73</sup>.

Se ha mencionado la existencia de un déficit en la maquinaria oxidativa celular en los pacientes con EPOC objetivada por una disminución de la actividad de enzimas oxidativas pertenecientes al ciclo de Krebs como la citrato sintetasa y la hidroxil-coA deshidrogenasa<sup>82</sup>, que se correlaciona de forma significativa con el  $\text{VO}_2$  pico. En este sentido, el inicio precoz de la producción de ácido láctico a niveles moderados de ejercicio puede explicarse por diversos fenómenos como la alteración del transporte muscular de  $\text{O}_2$ , el reclutamiento de fibras tipo II, de metabolismo predominantemente anaeróbico, o la disminución de la capacidad oxidativa del miocito. Aspecto, este último, en el que se profundizará en la presente tesis.

La alteración de las relaciones transporte/utilización de  $\text{O}_2$  se asocia a una disminución de la eficiencia del músculo esquelético de estos pacientes. Así, la relación fósforo inorgánico/fosfocreatina (Pi/PCr) durante el ejercicio submáximo se encuentra incrementada en el músculo esquelético de los pacientes con EPOC en relación a sujetos normales<sup>74</sup>.

Asimismo, estos pacientes presentan mayor consumo de oxígeno en las extremidades inferiores a igual carga de submáxima<sup>64;74</sup> que podría explicarse por el aumento del

porcentaje de fibras tipo II. En este sentido, existe evidencia convincente de que el coste energético del trabajo generado por el músculo es dependiente del tipo de fibras siendo las fibras tipo II las de menor eficiencia con un mayor coste energético por unidad de trabajo<sup>83</sup>. El aumento de la actividad de la citocromo oxidasa<sup>84</sup>, último aceptor de electrones, es consistente con el incremento del consumo de oxígeno a igual carga observado en estos pacientes.

### **Pérdida de masa muscular**

Dependiendo de la población estudiada, entre 17 y 35% de los pacientes con EPOC presentan pérdida de peso<sup>17;20;21;85;86</sup>. La asociación entre pérdida de peso y severidad de la EPOC es ampliamente reconocida. El peso corporal se correlaciona de manera positiva con la tolerancia al ejercicio en estos pacientes<sup>85;86</sup>. Más aun, la pérdida de peso se asocia a un incremento del número de hospitalizaciones secundarias a exacerbaciones<sup>87</sup> y a una disminución de la supervivencia de estos pacientes<sup>12;88-91</sup>.

La pérdida de peso corporal en esta población de pacientes tiene lugar fundamentalmente a expensas de la masa muscular<sup>20</sup>. Además, la pérdida de masa muscular influye directamente en la capacidad de desarrollo de fuerza del músculo<sup>5;22;23</sup> y en la tolerancia al ejercicio<sup>8;9;20;92</sup>, de manera independiente del grado de obstrucción bronquial expresado por el FEV<sub>1</sub><sup>92</sup> y de manera más adecuada que el BMI<sup>8</sup>. Asimismo, la disminución de la masa muscular constituye un mejor predictor de calidad de vida relacionada con la salud<sup>93</sup> y de supervivencia<sup>13;14</sup> que el peso corporal. De esta forma, el análisis de la composición corporal en al menos dos compartimientos, el tejido graso (del inglés *fat mass*, FM) y el tejido libre de grasa (FFM) que representa la masa de tejido metabólicamente activo (hígado, intestinos, sistema inmune y fundamentalmente tejido muscular contráctil) más los fluidos y sólidos extracelulares, aporta una aproximación más adecuada para la evaluación del contenido de tejido muscular.

La disminución de la FFM se presenta en un 18 a 36 % de estos pacientes<sup>17;20</sup>, pudiendo incluso presentarse en un 6 a 21 % de pacientes con peso corporal normal<sup>17;20;21</sup>. La medición de la FFM mediante bioimpedancia eléctrica, constituye un procedimiento sencillo y proporciona una variable clínica más adecuada para evaluar la pérdida de masa muscular<sup>23;94</sup> en los pacientes con EPOC.

## CAMBIOS ETIOPATOGÉNICOS DE LA DISFUNCIÓN MUSCULAR EN LA EPOC

A pesar de ser la disfunción muscular el efecto sistémico de la EPOC más extensamente estudiado, los mecanismos etiopatogénicos que la condicionan no están aún del todo aclarados. Es importante resaltar que estamos ante dos fenómenos conceptualmente diferenciados aunque posiblemente relacionados entre sí: a) el funcionamiento muscular anómalo; y, b) la pérdida de masa muscular que ocurre en un subgrupo de pacientes. Diversos estudios de revisión<sup>95-97</sup> han caracterizado las alteraciones del músculo esquelético periférico de los pacientes con EPOC y han identificado la naturaleza multifactorial del problema.

### Alteraciones en el recambio proteico

Diversos estudios demuestran alteraciones en el recambio proteico en la EPOC<sup>98</sup>. La determinación de si la pérdida de masa muscular en los pacientes con EPOC se debe a una disminución de la síntesis proteica, a un aumento de la degradación, o a ambos factores resulta de cabal importancia por su implicación en la identificación de los mecanismos íntimos del proceso y por las eventuales implicaciones en el tratamiento. Se han identificado anomalías tanto en la síntesis proteica<sup>99</sup> como a nivel de la regulación de la proteólisis<sup>100</sup>. El papel del sistema proteolítico ubiquitin-proteasoma<sup>101-103</sup> en el equilibrio entre síntesis y degradación de proteínas musculares no ha sido aun explorado en la EPOC.

Los niveles de insulina, de hormona de crecimiento (GH), del factor de crecimiento simil-insulina (IGF-1) y de otras hormonas anabolizantes favorecen la síntesis proteica, fundamentalmente a nivel muscular aumentando la síntesis e inhibiendo la degradación proteica<sup>104;105</sup>. Algunos estudios encuentran niveles disminuidos de IGF-1 en la EPOC<sup>106</sup>. Estos cambios hormonales han sido relacionados con la acción de diversos factores inflamatorios, alguno de los cuales se encuentran presentes en concentraciones anormalmente elevadas en la EPOC<sup>107</sup>. La infusión de IL-1 y TNF $\alpha$  en animales se asocia a una disminución de los niveles circulantes de IGF-1 y a una reducción de la síntesis proteica<sup>108</sup>. A su vez, la exposición a TNF $\alpha$  inhibe la síntesis proteica inducida por IGF-1<sup>109</sup>.

Por otra parte se han descrito niveles anormalmente bajos de testosterona en pacientes con EPOC<sup>110</sup>. La administración de diversas hormonas como la GH<sup>111;112</sup>, o la testosterona<sup>18;113-115</sup>, ha generado un incremento de la masa muscular y de la capacidad de generación de fuerza, sin cambios significativos en la resistencia muscular y la tolerancia al ejercicio.

### **Trastornos nutricionales**

La pérdida de masa muscular es el mecanismo principal de pérdida de peso observada en la EPOC<sup>20</sup>, mientras que la pérdida de masa grasa contribuye a ésta en menor medida<sup>20</sup>. Es importante diferenciar los términos “malnutrición” y “caquexia”. El primero constituye un trastorno asociado a la disminución de la ingesta calórica con una tasa metabólica disminuida y buena respuesta al soporte nutricional. En este caso existe una conservación relativa de la masa muscular. El término “caquexia” es, en realidad, el que más se ajusta al fenómeno que tiene lugar en la EPOC. La caquexia se caracteriza por una tasa metabólica elevada sin una disminución de la ingesta calórica, su origen es menos claro y la respuesta a los suplementos calóricos es pobre. En este caso la pérdida de peso se asocia a una pérdida concomitante de masa muscular. Existe una tercera posibilidad que se presenta en un porcentaje no despreciable de pacientes con EPOC. Nos referimos a la sarcopenia o pérdida de masa muscular que puede darse aún en ausencia de pérdida de peso<sup>20;21;116</sup>.

La disminución de la ingesta calórica no parece ser un factor relevante en pacientes con EPOC, excepto durante episodios de exacerbación<sup>117</sup>. El metabolismo basal se encuentra incrementado en pacientes con EPOC<sup>118</sup>, fundamentalmente en aquellos con bajo peso<sup>119</sup>. Este incremento se explicaba tradicionalmente por un aumento del consumo de oxígeno por parte de los músculos respiratorios debido al aumento del trabajo ventilatorio que caracteriza a la EPOC<sup>120</sup>. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que los músculos no respiratorios presentan un consumo de oxígeno exagerado durante el ejercicio pudiendo contribuir a un aumento de la tasa metabólica en estos pacientes<sup>64;74</sup>. Asimismo el consumo energético necesario para la realización de las actividades de la vida diaria es significativamente mayor en pacientes con EPOC que en los sujetos control<sup>121;122</sup>. Este hecho explica la menor eficiencia mecánica, definida como el coste energético para realizar ejercicio a niveles submáximos<sup>64;74;123</sup>.



Un metabolismo energético elevado parcialmente compensado por una ingesta calórica inadecuada a estos requerimientos podría constituir una base para explicar la caquexia en pacientes con EPOC<sup>118</sup>.

### **Sedentarismo**

La disnea desencadenada por el ejercicio es un elemento importante como factor explicativo del hábito sedentario que caracteriza a los pacientes con EPOC, que conlleva una disminución de la actividad contráctil del músculo.

El entrenamiento físico constituye una estrategia terapéutica que permite revertir algunas de las alteraciones musculares atribuibles al desuso muscular en pacientes con EPOC. Este apartado, de relevancia conceptual para la tesis, será desarrollado posteriormente de forma más extensa.

### **Corticosteroides**

La miopatía esteroidea se define por el conglomerado de cambios histopatológicos, bioquímicos y funcionales que ocurren a nivel muscular en individuos que han sido tratados con corticosteroides en ausencia de otras causas de miopatía. Constituye el efecto adverso asociado al uso de fármacos más frecuente a nivel muscular en la EPOC. Ha sido descrito un efecto agudo y un efecto crónico asociado al uso de éste tipo de fármacos. La miopatía esteroidea aguda es un efecto adverso raro, no descrito en pacientes con EPOC, secundario a la administración intravenosa de corticosteroides, y se acompaña de rabdomiolisis<sup>124;125</sup>. Por el contrario, la miopatía esteroidea crónica, constituye la clásica miopatía asociada al uso prolongado de corticosteroides por vía oral en la cual la rabdomiolisis esta ausente. Esta entidad se caracteriza por fenómenos de atrofia difusa con afectación predominante de fibras tipo IIx<sup>126</sup>. Los corticosteroides pueden afectar la producción de proteínas contráctiles y disminuir la expresión del IGF-1. Habría una relación estrecha entre dosis y duración del tratamiento con la extensión de los cambios estructurales y funcionales a nivel muscular.

Así, el uso de corticosteroides por vía oral de forma prolongada puede constituirse en una causa de miopatía específica en pacientes con EPOC. Sin embargo los cambios estructurales descritos en pacientes cuidadosamente seleccionados en ausencia de

tratamiento corticosteroide sugiere la presencia de otros fenómenos causales en la génesis de la disfunción muscular asociada a la EPOC.

### **Hipoxia tisular e hipercapnia**

La composición adecuada de los gases respiratorios en sangre arterial constituye una de las funciones primordiales del pulmón. La incapacidad, en forma continua o intermitente, de mantener presiones arteriales normales de oxígeno y dióxido de carbono son fenómenos frecuentemente asociados a la EPOC.

El papel de la hipoxia tisular, aún en ausencia de hipoxemia arterial en reposo, como factor etiopatogénico de la disfunción muscular en la EPOC tiene su base en numerosas publicaciones que aportan evidencia en este sentido. La hipoxia celular, un factor que limita la producción energética celular, afecta claramente la síntesis proteica celular<sup>127</sup>. Está bien establecido que sujetos sanos en condiciones de hipoxia hipobárica, como la altura, presentan pérdida de masa muscular<sup>128;129</sup> e incremento de la actividad de enzimas glicolíticas con disminución de la actividad de enzimas del ciclo de Krebs<sup>130</sup>. La hipoxia produce una inhibición aguda de la síntesis de proteínas mitocondriales<sup>131</sup>. Además la hipoxia crónica inhibe la síntesis proteica en células musculares causando una pérdida neta de aminoácidos y reduciendo la expresión de miosina<sup>132;133</sup>. Por su parte, niveles inadecuadamente elevados de dióxido de carbono contribuyen de manera significativa a incrementar la acidosis intracelular en el músculo esquelético<sup>134</sup>. La acidosis intracelular conlleva efectos deletéreos en la maquinaria enzimática de la célula muscular inhibiendo la actividad de enzimas clave en el metabolismo energético<sup>135</sup>. Estudios realizados en pacientes con insuficiencia respiratoria aguda demuestran niveles disminuidos de ATP y fosfocreatina intracelulares<sup>136</sup>. Además, la incubación de músculo aislado a niveles elevados de dióxido de carbono resulta en una disminución de los niveles de fosfocreatina y en la relación ATP/ADP<sup>137</sup>. En las exacerbaciones severas de la EPOC, la acidosis es un fenómeno que frecuentemente acompaña a la hipoxemia. La acidosis estimula la degradación proteica mediada por el sistema ubiquitina-proteasoma<sup>138</sup>. Más aún, la corrección de la acidosis tanto en modelos animales como en humanos reduce la tasa de degradación proteica<sup>139;140</sup>. En este sentido la hipoxia tisular y la hipercapnia, continua o intermitente, puede actuar tanto como favorecedor de la pérdida de masa muscular como a nivel del metabolismo energético muscular.

## Inflamación sistémica

La inflamación sistémica constituye uno de los mecanismos fisiopatológico más relevantes en la génesis de la disfunción muscular en la EPOC. Diversos estudios demuestran alteraciones a nivel de las células inflamatorias circulantes, fundamentalmente neutrófilos y linfocitos. Las propiedades quimiotácticas y de proteólisis extracelular<sup>141</sup>, así como la producción de especies reactivas de oxígeno<sup>142</sup>, se encuentra incrementada en neutrófilos aislados de pacientes con EPOC. Asimismo, la expresión de diversas moléculas de adhesión, particularmente Mac-1 en neutrófilos circulantes, se encuentra incrementada<sup>143</sup>, comprometiendo el proceso de eliminación de neutrófilos de los tejidos inflamados.

Las concentraciones plasmáticas de diversas citocinas proinflamatorias, fundamentalmente el TNF $\alpha$ <sup>21;107;144-146</sup>, así como las concentraciones plasmáticas de sus receptores solubles<sup>21;144;145</sup>, se encuentran elevadas en pacientes con EPOC. El TNF $\alpha$ , la IL-1, la IL-6 y el IF $\gamma$  son las citocinas pro-inflamatorias consideradas como efectores más probables en la génesis de la pérdida de masa muscular en numerosas patologías caracterizadas por presentar sarcopenia.

La producción de TNF $\alpha$  por monocitos circulantes provenientes de pacientes con EPOC se encuentra incrementada<sup>147</sup>, particularmente en el subgrupo de pacientes con bajo peso<sup>107</sup>. El TNF $\alpha$  puede afectar a las células musculares de diversas maneras<sup>148</sup>. Esta citocina interrumpe el proceso de diferenciación muscular<sup>149</sup> mediante el cual las células satélite musculares se diferencian, proliferan y se fusionan con otras células, constituyendo el mecanismo fundamental de regeneración secundaria a la injuria muscular.

En miocitos diferenciados estudiados *in vitro*, la exposición a TNF $\alpha$  produce la degradación de la cadena pesada de miosina a través del sistema ubiquitin/proteasoma<sup>148</sup>. Se trata de un efecto mediado por la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B. El TNF $\alpha$  puede, a su vez, inducir la expresión de otras citocinas pro-inflamatorias contribuyendo a la amplificación de la respuesta inflamatoria<sup>148</sup>.

Por otro lado, el TNF $\alpha$  puede inducir apoptosis en diversos sistemas celulares<sup>150</sup> a través, por ejemplo, de promover la fragmentación del ADN<sup>151</sup>. La combinación de la reducción de la actividad contráctil asociada al sedentarismo y los elevados niveles de TNF $\alpha$  podrían inducir una pérdida significativa de las células satélite.

Se ha demostrado un aumento de la apoptosis en el músculo esquelético de pacientes con EPOC y bajo índice de masa corporal en relación a pacientes con peso normal y a sujetos sedentarios sin EPOC<sup>152</sup>.

### **Estrés oxidativo/nitrosativo**

Una parte importante de los manuscritos que forman el cuerpo de esta tesis se relacionan con el papel del estrés oxidativo como mecanismo etiopatogénico en la disfunción muscular asociada a la EPOC. Es importante la comprensión de este mecanismo patogénico para favorecer un mejor entendimiento del contenido de los mismos. Este apartado, de relevancia conceptual para la tesis, será desarrollado posteriormente de forma más extensa.



# Los Músculos Respiratorios en la EPOC

Los cambios en la morfología de la caja torácica secundarios a la hiperinsuflación conjuntamente con las alteraciones de la mecánica respiratoria que favorece el atrapamiento aéreo, generan una alteración en la eficacia contráctil de la musculatura inspiratoria, fundamentalmente del diafragma (disminución de la relación longitud-tensión; disminución del área de aposición, disminución de la curvatura diafragmática, etc.). Esto impacta negativamente en la capacidad de generar fuerza y aumenta de forma notable el trabajo respiratorio, contribuyendo, en gran parte, al desencadenamiento de la sensación de disnea que aqueja a estos pacientes. De esta forma, los músculos inspiratorios se enfrentan a una sobrecarga mecánica crónica. Así, a diferencia de los músculos esqueléticos periféricos, la falta de actividad no parece ser una causa relacionada con la disfunción de la eficacia contráctil de los músculos respiratorios<sup>153</sup>.

Existe evidencia de que el diafragma y otros músculos respiratorios expresan diversos cambios adaptativos en respuesta a la sobrecarga mecánica impuesta por la enfermedad. A diferencia de lo que ocurre en la musculatura periférica en pacientes con EPOC, el diafragma de estos pacientes presenta una mayor densidad mitocondrial que el de sujetos de igual edad y sexo sin enfermedad pulmonar<sup>154;155</sup>. La actividad de enzimas vinculadas al metabolismo aeróbico se encuentra incrementado en el diafragma de estos pacientes<sup>57</sup>. Por último el porcentaje de fibras tipo I se encuentra incrementado en el diafragma de pacientes con EPOC mientras que el porcentaje de fibras tipo IIa y IIx se encuentra disminuido<sup>156</sup>.

A pesar de las adaptaciones descritas, los músculos respiratorios de los pacientes con EPOC muestran una disminución de la capacidad de generar fuerza y una disminución

de la resistencia<sup>157</sup> debidas al cambio en la geometría muscular impuesto por el fenómeno de hiperinsuflación. Los fenómenos de adaptación que ocurren a nivel de los músculos respiratorios, son insuficientes para restaurar la función muscular normal en estos pacientes.

El resultado último de las adaptaciones del músculo respiratorio y la sobrecarga crónica es un frágil equilibrio puede verse alterado de forma progresiva o aguda en situaciones tales como episodios de exacerbación o complicaciones de la enfermedad.



## Sedentarismo y Entrenamiento Muscular en la EPOC

La plasticidad del tejido muscular es tal, que cambios en la carga desarrollada por el músculo tienen un efecto dramático en el tamaño muscular y la capacidad metabólica de sus fibras. El sedentarismo afecta al músculo tanto en lo que se refiere a su trofismo como a su capacidad oxidativa. La inactividad física causa pérdida de masa muscular, reduce la capacidad de generar fuerza, y disminuye el umbral de fatiga afectando la resistencia muscular<sup>158</sup>. Asimismo genera pérdida de masa muscular debida a una disminución de la síntesis conjuntamente con un aumento en la degradación proteica<sup>159-161</sup>. Aún por cortos períodos de tiempo, la disminución de la actividad contráctil, resulta en una pérdida de masa muscular significativa<sup>162</sup>. El sistema ubiquitin-proteasoma parece tener un papel clave en la pérdida de masa muscular secundaria a la inmovilización<sup>163-165</sup>.

El hecho de que el entrenamiento físico mejore la función muscular en pacientes con EPOC refuerza el concepto de que el sedentarismo es un factor importante como condicionante de la disfunción muscular<sup>74;166;167</sup>. Asimismo, el entrenamiento físico puede incrementar de forma moderada el peso de los pacientes con EPOC a expensas de un aumento en la FFM<sup>168</sup>.

Hasta fines de la década de los 80', se creía que el entrenamiento físico solo aportaba beneficios psicológicos a los pacientes con EPOC<sup>169</sup>. Actualmente la evidencia no puede ser más clara en el sentido de que el entrenamiento físico mejora la tolerancia al ejercicio y la calidad de vida relacionada con la salud en este tipo de pacientes. Numerosos artículos científicos lo demuestran<sup>74;96;170</sup>. Al menos un documento basado en la evidencia<sup>171</sup> y un meta-análisis<sup>172</sup> recientemente publicados avalan de forma clara éste hecho. Desde el punto de vista fisiológico, los pacientes con EPOC presentan

diferencias en los mecanismos de adaptación al entrenamiento físico en relación a individuos sanos de igual edad y sexo pero sin patología pulmonar<sup>74</sup>. Así, los mecanismos fisiológicos de adaptación al entrenamiento físico tienen lugar fundamentalmente a nivel muscular en pacientes con EPOC, en los que ésta estrategia terapéutica demostró una mejoría sustancial en la capacidad oxidativa del músculo entrenado, sin un impacto sustancial en los mecanismos centrales (flujo sanguíneo dirigido a los músculos, ventilación minuto, transporte de oxígeno) a nivel de ejercicio pico. Por el contrario, los individuos sanos muestran una capacidad de adaptación fundamentalmente a nivel de los factores centrales que gobiernan el transporte convectivo de oxígeno, a niveles de ejercicio pico<sup>74</sup>. Asimismo, es importante destacar que esta estrategia de tratamiento ha contribuido a arrojar luz sobre los mecanismos que condicionan la disfunción muscular en la EPOC, particularmente el fenómeno de desuso muscular provocado por el sedentarismo. Así, el entrenamiento físico en pacientes con EPOC raramente alcanza a normalizar la función muscular por completo. Más aún, algunas de las alteraciones descritas en el músculo no son explicadas por el hábito sedentario de estos pacientes. Por ejemplo la inactividad física se asocia a una disminución de la actividad de la citocromo oxidasa, actividad que se encuentra incrementada en el músculo esquelético de pacientes con EPOC<sup>84</sup>. Este mismo comportamiento de la citocromo oxidasa se encuentra en linfocitos circulantes de pacientes con EPOC, células que escapan a la influencia del sedentarismo<sup>173</sup>. Por otro lado, los cambios morfológicos en el músculo esquelético secundarios a la inmovilización se caracterizan por una atrofia fundamentalmente de fibras tipo I y IIa<sup>174</sup> a diferencia de la atrofia muscular predominantemente de fibras tipo IIx característica de los pacientes con EPOC<sup>65</sup>.

A su vez, el entrenamiento físico induce, en el término de 24 h, la expresión de genes que favorecen el trofismo muscular luego de la inmovilización<sup>165</sup>. La reducción del tamaño fibrilar puede revertirse, al menos parcialmente, con el entrenamiento físico<sup>58</sup>. Sin embargo estos cambios son proporcionalmente inferiores a la mejoría de la capacidad de realizar ejercicio y a la fuerza muscular<sup>168</sup>. Todo esto pone de manifiesto que, aunque el sedentarismo puede claramente relacionarse con la pérdida de masa muscular y con otros elementos que hacen a la disfunción muscular en la EPOC<sup>74;166;167</sup>, otros factores fisiopatológicos coadyuvantes son necesarios para explicar las alteraciones observadas en los pacientes. Por este motivo el entrenamiento físico en



la EPOC no solo constituye una terapia dirigida a revertir los efectos del sedentarismo sobre el músculo periférico de estos pacientes, sino que constituye una herramienta que permite profundizar en el entendimiento de los mecanismos etiopatogénicos responsables de la disfunción muscular periférica que afecta a estos pacientes. Con este espíritu, el entrenamiento muscular, se ha empleado en los diferentes trabajos originales que forman parte de esta tesis.





## El Estrés Oxidativo/Nitrosativo como Mecanismo Patogénico

Se entiende por estrés oxidativo/nitrosativo a la citotoxicidad causada por especies reactivas de oxígeno (ROS, reactive oxygen species) y de óxido nítrico (RNS, reactive nitrogen species)<sup>175</sup>. Las especies reactivas incluyen a moléculas como el *anión superóxido* ( $O_2^-$ ), el *peróxido de hidrógeno* ( $H_2O_2$ ), el *radical hidroxilo* ( $\cdot OH$ ) y *peroxinitrito* ( $ONNO\cdot$ ). Aunque los oxidantes se generan durante procesos biológicos normales, su capacidad de modificar diversas moléculas de forma perjudicial está bloqueada por una variedad de sistemas antioxidantes intra- y extracelulares entre los cuales se destacan: a) sistemas enzimáticos (superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutathion peroxidasa), b) macromoléculas (ceruloplasmina, transferrina); y, c) pequeñas moléculas (glutathion, metionina, vitamina C, vitamina E). La citotoxicidad se deriva del desequilibrio entre la producción de ROS/NOS y los mecanismos intracelulares de defensa antioxidantes<sup>175</sup>. Diversos estudios relacionan el desarrollo y la progresión de la EPOC con un incremento de la producción de moléculas pro-oxidantes o una disminución de los recursos antioxidantes celulares tanto en el pulmón como a nivel sistémico.

Los niveles de  $H_2O_2$  en el aire exhalado se encuentran elevados en sujetos fumadores y pacientes con EPOC en comparación con ex fumadores con EPOC y sujetos no fumadores<sup>176;177</sup>. Éste fenómeno se ve incrementado durante los episodios de exacerbaciones de la enfermedad<sup>178</sup>. Asimismo, los macrófagos alveolares provenientes de sujetos fumadores presentan un incremento de la producción de anión superóxido<sup>178;179</sup>. Además, la actividad de la enzima xantino oxidasa, capaz de generar anión superóxido y peróxido de hidrógeno, se encuentra incrementada en

el líquido de lavado broncoalveolar y en el plasma de pacientes con EPOC y sujetos fumadores en comparación con sujetos sanos y no fumadores respectivamente<sup>180;181</sup>.

Sujetos fumadores al igual que pacientes con EPOC presentan evidencia de estrés oxidativo en la circulación sistémica, particularmente durante las exacerbaciones<sup>182</sup>. El tabaquismo incrementa los niveles plasmáticos de  $F_2$ -isoprostanos, un producto de la peroxidación del ácido araquidónico<sup>183</sup>. El estrés oxidativo generado por el tabaco contribuye a las alteraciones cardiovasculares asociadas a este hábito y explican la disfunción endotelial sistémica presente en individuos fumadores<sup>184;185</sup>. El humo de tabaco contiene componentes potencialmente dañinos para el músculo esquelético a través de diversos mecanismos, además del estrés oxidativo. La nicotina puede alterar la expresión de ciertos factores de crecimiento como el TGF- $\beta$ 1, involucrado en el mantenimiento de la masa muscular<sup>186</sup> y compite con la acetilcolina por el receptor en la unión neuromuscular pudiendo potencialmente afectar la contracción muscular<sup>187</sup>. De esta forma es lícito especular en que el tabaquismo resulta en si mismo un factor relevante en la génesis de la disfunción muscular que caracteriza a los pacientes con EPOC.

En orina, los niveles de  $F_2\alpha$ -III isoprostano se encuentran elevados en pacientes con EPOC en comparación con sujetos sanos; estas diferencias fueron, también, más pronunciadas durante las exacerbaciones<sup>188</sup>. A su vez, el ejercicio intenso causa oxidación del glutatión plasmático<sup>189</sup> e incrementa los niveles plasmáticos de malondialdehído (MDA), otro producto de peroxidación lipídica<sup>181</sup> en pacientes con EPOC. Más aun, este efecto del ejercicio intenso es inhibido con la administración de fracciones inspiradas de oxígeno elevadas<sup>189</sup> y halopurinol<sup>181</sup>, un inhibidor de la xantina oxidasa, lo que indicaría que la hipoxia tisular constituye una posible fuente de radicales libres durante el ejercicio mediada por este enzima.

A nivel muscular, los ROS ejercen un efecto bifásico en la contractilidad muscular siendo esenciales, en bajas concentraciones, para un normal desarrollo de fuerza mientras que disminuyen la capacidad contráctil del músculo a altas concentraciones<sup>190</sup>.

De esta forma, el estrés oxidativo puede tener un papel etiopatogénico en la disfunción muscular a dos niveles distintos. Además de, potencialmente interferir en la contractilidad muscular pudiendo llevar a la fatiga precoz y a la disminución de la resistencia, los ROS pueden también tener un papel importante en la facilitación de la degradación proteica en el músculo esquelético<sup>191;192</sup>, modificando las cadenas de

aminoácidos, formando agregados proteicos y rompiendo uniones peptídicas<sup>193</sup>. Esta modificación de la estructura proteica<sup>194</sup>, puede mediar mecanismos de proteólisis muscular<sup>191;192</sup> favoreciendo la pérdida de masa muscular.

Teniendo en cuenta que el daño oxidativo proteico, y la formación de proteínas carboniladas puede ser prevenido por antioxidantes como el ácido ascórbico y el glutathione, un desequilibrio entre la formación de ROS y la capacidad antioxidante celular puede jugar un papel importante en la génesis de la pérdida de masa muscular en la EPOC.

Por su parte, el NO, producido en condiciones fisiológicas, regula una innumerable cantidad de funciones celulares mediante la modificación post translacional de diversas proteínas. Esto ocurre fundamentalmente a nivel de residuos de cisterna (S-nitrosilación). El anión superóxido, en concentraciones fisiológicas, favorece esta reacción. Sin embargo, a concentraciones patológicas, ésta molécula interfiere en la S-nitrosilación al interactuar directamente con las proteínas y formando RNS al unirse al NO. Así, el peroxinitrito ( $\text{ONNO}^-$ ) y otras especies reactivas de nitrógeno (RNS) se forman por la reacción de anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) y óxido nítrico (NO). Los RNS, a su vez, reaccionan con residuos tirosinados de las proteínas formando 3-nitrotirosina. Este producto del estrés nitrosativo, a su vez, ha sido implicado en la etiopatogenia de diversas enfermedades cardiovasculares. El NO se forma por acción de tres sintetasas (NOS) del NO. Todas ellas se expresan en el músculo esquelético<sup>195</sup>. Dos isoformas de la NOS, la tipo I (neuronal) y la tipo III (endotelial) se expresan de manera constitutiva, mientras que la tercera isoforma, la tipo II (inducible, iNOS), se expresa en respuesta a diversos estímulos, incluyendo citocinas, oxidantes e hipoxia<sup>195</sup>. La inflamación sistémica puede inducir la expresión de iNOS en el músculo esquelético<sup>196</sup>. El músculo esquelético de pacientes con EPOC presenta, de hecho, sobreexpresión de iNOS<sup>197</sup>. La producción de NO resultante de la inducción de la iNOS puede derivar en el incremento de la producción de nitrotirosina y facilitar la degradación proteica mediada por el sistema ubiquitin/proteasoma<sup>191</sup> e incrementar los niveles de apoptosis<sup>198</sup>. Finalmente, la inducción de la iNOS puede también ocasionar una disminución de las propiedades contráctiles del músculo<sup>199</sup> interfiriendo, de esta forma, en la adecuada tolerancia al ejercicio.

Los oxidantes relacionados con las enfermedades humanas derivan de tres fuentes: a) generados en procesos biológicos intracelulares fisiológicos; b) generados en relación a procesos inflamatorios; y, c) de origen exógeno, como sería el caso del tabaquismo.

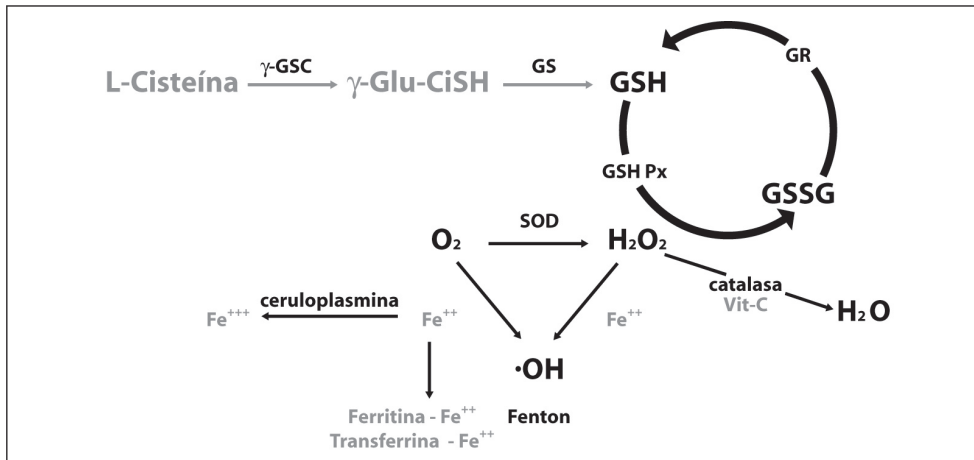
Aunque la mitocondria es la principal fuente potencialmente generadora de ROS, hay diversas fuentes de producción de ROS extra-mitocondrial como el metabolismo prostanoide, la autooxidación de catecolaminas, la actividad NAD(P)H oxidasa y la NO sintetasa. Las moléculas derivadas del metabolismo de la xantino oxidasa (XO) han sido relacionadas con el estrés oxidativo secundario a mecanismos de hipoxia/reperfusión. La mitocondria cobra cabal importancia en la generación de ROS como consecuencia de la utilización de oxígeno en la cadena de la fosforilación oxidativa con generación de ATP. Éstos se producen en segmentos específicos de la cadena de transporte de electrones, fundamentalmente en el pool ubiquinona del complejo III, donde un electrón de ubisemiquinona es transferido directamente a una molécula de oxígeno<sup>200-203</sup> formándose una molécula de anión superóxido y a nivel del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial<sup>204</sup>. Éste tiene un radio de difusión muy corto aunque puede transformarse en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por acción de la superóxido dismutasa (SOD). A su vez, el  $H_2O_2$  es convertido por la catalasa en  $H_2O + O_2$  siendo de esta forma neutralizado. Aunque el peróxido de hidrógeno no es estrictamente un radical libre, es un potente oxidante. Tanto el anión superóxido como el peróxido de hidrógeno pueden generar radicales hidroxilo ( $\cdot OH$ ) en presencia de metales, por ejemplo  $Fe^{++}$  (reacción de Fenton).

Los ROS producidos en forma controlada están involucrados en un número importante de procesos biológicos entre los que se encuentra la regulación génica a través de la activación de la ligadura al ADN de ciertos factores de transcripción dependientes del estado redox<sup>205</sup>. Numerosos estudios implican a los ROS como participantes en una variedad de señales intracelulares como activación de kinasas<sup>206</sup>, de NFkB<sup>207</sup> etc. Además, la producción de ROS a nivel mitocondrial es uno de los mecanismos postulados, entre otros, como mediador de la señalización intracelular de mecanismos de adaptación a la hipoxia<sup>208;209</sup>.

Sin embargo, la generación incontrolada de ROS puede sobrepasar los mecanismos de protección antioxidante y derivar en estrés oxidativo y daño celular. Los sistemas de protección contra los oxidantes involucran a mecanismos de reparación del daño producido por estas moléculas a nivel de lípidos, proteínas o ADN y otros sistemas encargados de neutralizarlas, anteriormente citados. Entre estos, el sistema del glutatión constituye uno de los mecanismos de defensa antioxidante intracelular más importantes.

El glutatión no está homogéneamente distribuido en la célula, 85 % se encuentra

en el citoplasma donde es sintetizado en forma exclusiva. Esta síntesis involucra el ensamble de tres aminoácidos (glutamato, cisteína y glicina) en dos reacciones enzimáticas con gasto de ATP catalizadas por la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa ( $\gamma$ GCS) y la GSH sintetasa. De estas dos enzimas, la  $\gamma$ GCS es considerada el paso limitante en la síntesis de GSH. Esta enzima está constituida por dos subunidades, la cadena pesada (unidad catalítica) y la liviana (que modula la afinidad de la cadena pesada por sus substratos e inhibidores). Un 10 a 15 % del GSH se encuentra en la mitocondria, donde alcanza concentraciones similares a las citoplasmáticas. La mitocondria no sintetiza GSH; éste es translocado al interior de la mitocondria en forma activa por un transportador<sup>210</sup>. La depleción del GSH del citoplasma con el mantenimiento de niveles mitocondriales adecuados conlleva una moderada consecuencia del estrés oxidativo por generación de ROS dentro de la mitocondria. Sin embargo estas manifestaciones son mucho más marcadas cuando hay depleción del pool intramitocondrial por debajo del 20 % de su nivel normal<sup>211</sup>. El Glutation (GSH) mitocondrial es la única defensa contra el peróxido de hidrógeno formado en este compartimiento celular. La relación entre la producción de ROS y alguno de los sistemas antioxidantes más importantes se puede observar en la **figura 2**.



**Figura 2.** El radical superóxido es transformado en peróxido de hidrógeno por la SOD. Éste, a su vez, puede ser neutralizado por la vía de la catalasa o la GSH Px que conlleva la oxidación de GSH a GSSG. A su vez, el peróxido de hidrógeno y el radical superóxido pueden formar un radical hidroxilo mediante la interacción con metales como el  $Fe^{++}$  (reacción de Fenton). La ferritina (dentro de la célula) y la transferrina (fuera de esta) previenen esta reacción al unirse al hierro. La ceruloplasmina, a su vez, lo hace oxidando al  $Fe^{++}$  en  $Fe^{+++}$ . La secuencia enzimática que tiene lugar en la síntesis de GSH también se grafica en esta figura. Asimismo, el GSSG es reciclado a GSH por acción de la glutatión reductasa (GR).

La medición directa de ROS *in vivo* presenta la dificultad de que éstos tienen una vida media excesivamente corta<sup>175</sup>, así, son los efectos citotóxicos de los ROS, como la peroxidación lipídica, los marcadores de estrés oxidativo más extensamente estudiados.





## OBJETIVO I - EFECTOS DEL ENTRENAMIENTO SOBRE EL SISTEMA GLUTATION

Uno de los objetivos centrales de esta tesis es el análisis de las relaciones entre los efectos del entrenamiento físico y el estado redox muscular en pacientes con EPOC. La distinción entre la miopatía como efecto sistémico de la enfermedad y los fenómenos secundarios al desuso muscular que se deriva del sedentarismo continúa siendo un tema de debate. El entrenamiento físico de resistencia puede constituir una herramienta de utilidad como forma de evaluar la relación entre actividad muscular y sistema redox intracelular. La información generada puede tener un alto impacto en el planteamiento de nuevas estrategias de tratamiento de la disfunción muscular en la EPOC.

El entrenamiento al ejercicio constituye una estrategia efectiva en el tratamiento de los pacientes con EPOC<sup>2</sup>, con efectos positivos demostrados sobre la calidad de vida relacionada con la salud, la tolerancia al ejercicio, el curso de la enfermedad y la utilización de recursos sanitarios.

En estudios previos, se ha verificado que, en pacientes con EPOC de moderada-severa intensidad sin efectos sistémicos valorables, el entrenamiento restaura la bioenergética del músculo esquelético periférico a niveles próximos a los observados en los sujetos sanos<sup>74</sup>. El ejercicio físico intenso aumenta la producción de ROS en sujetos sanos<sup>212</sup> y en pacientes con EPOC<sup>213</sup>. El estímulo repetitivo generado por el entrenamiento físico genera mecanismos de adaptación que potencian la capacidad de defensa antioxidante intracelular, siendo el sistema del glutatión uno de los mecanismos

más relevantes de prevención del estrés oxidativo generado por el ejercicio.

## Manuscrito I

### ***Reduced Muscle Redox Capacity after Endurance Training in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease***

*Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:1114-8.

#### *Hipótesis*

Los pacientes con EPOC pueden presentar mejoría de la bioenergética muscular post-entrenamiento similar a la observada en sujetos sanos, pero los fenómenos de adaptación del sistema redox al entrenamiento físico son anormales en relación a los observados en los controles sedentarios de edad similar.

#### *Objetivo específico*

Examinar los efectos de un programa de entrenamiento de resistencia de ocho semanas de duración sobre el estado redox del cuádriceps crural en pacientes con EPOC representativos de un amplio espectro de severidad de la enfermedad y en sujetos sedentarios sanos.

## OBJETIVO II - RELACIONES ENTRE ESTRÉS OXIDATIVO Y PÉRDIDA DE MASA MUSCULAR

Diversos estudios indican la presencia de estrés oxidativo sistémico en la EPOC. Los radicales libres de oxígeno pueden tener efectos deletéreos sobre la contractilidad muscular y facilitar la degradación proteica. En pacientes susceptibles, la alteración del potencial redox puede constituir uno de los mecanismos fundamentales en la pérdida de masa muscular.

---

## Manuscrito II

### *Training Depletes Muscle Glutathione in COPD Patients with Low Body Mass Index*

*Respiration* 2005  
(enviado para publicación).

#### *Hipótesis*

El estrés oxidativo generado por el ejercicio altera la función del músculo esquelético y los mecanismos de regeneración muscular generando reducción de la masa muscular. Este fenómeno tiene mayor expresividad en pacientes con EPOC avanzado, que probablemente presentan una especial susceptibilidad genética.

#### *Objetivo específico*

Explorar las diferencias de la respuesta post-entrenamiento del sistema de glutatión en el *vastus lateralis* de pacientes con EPOC y BMI normal (BMI<sub>N</sub>), pacientes con EPOC y BMI bajo (BMI<sub>L</sub>) y sujetos sanos sedentarios.

## OBJETIVO III - INTERACCIONES ENTRE INFLAMACIÓN Y EJERCICIO

La inflamación sistémica es un fenómeno relevante en la EPOC. Diversas citocinas proinflamatorias, particularmente el TNF $\alpha$ , han sido implicadas en la génesis de pérdida de masa muscular asociada a diversas enfermedades crónicas y también al envejecimiento. Diferentes rutas de señalización intracelular relacionan inflamación y especies reactivas del oxígeno. Así, una alteración en el estado redox del músculo esquelético puede asociarse a una respuesta inflamatoria anómala. Por otra parte, la liberación de citocinas inflamatorias durante el ejercicio puede tener un papel relevante de señalización de la respuesta integrada del organismo al ejercicio.

## Manuscrito III

### *Increased Tumour Necrosis Factor- $\alpha$ Plasma Levels during Moderate-Intensity Exercise in COPD Patients*

*Eur Respir J.* 2003;21:789-94.

#### *Hipótesis*

El entrenamiento físico disminuye la expresión muscular y sistémica de TNF $\alpha$  en sujetos sanos de edad avanzada. La alteración del estado redox del músculo esquelético en los pacientes con EPOC puede asociarse a una respuesta inflamatoria anómala al entrenamiento físico

#### *Objetivo específico*

Examinar el efecto del ejercicio moderado y del entrenamiento físico sobre los niveles plasmáticos de: TNF $\alpha$ , IL6, receptores hidrosolubles de TNF $\alpha$  y la expresión de ARN mensajero de TNF $\alpha$  en la porción *vastus lateralis* del cuádriceps crural.

## OBJETIVO IV - ALTERACIONES DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL Y DISFUNCIÓN MUSCULAR

La mitocondria tiene un papel fundamental en la generación de ROS. La disminución de la capacidad oxidativa muscular por disminución de la actividad enzimática a nivel del ciclo de Krebs se ha identificado como una alteración característica de los pacientes con EPOC y disfunción muscular. Existe evidencia indirecta de que la limitación de la capacidad oxidativa mitocondrial puede tener un papel importante en la generación de niveles anormales de ROS durante el ejercicio con probable impacto sobre el fenómeno de pérdida de masa muscular.

---

## Manuscrito IV

### *Mitochondrial Electron Transport Chain Uncoupling in COPD Patients with Muscle Wasting*

*Eur Respir J.* 2005

(Enviado para publicación).

#### *Hipótesis*

Los desequilibrios entre demanda energética celular y la capacidad del sistema de transporte y utilización de oxígeno pueden generar alteraciones a nivel de la cadena respiratoria mitocondrial que tendrían un papel relevante en la disfunción muscular de pacientes con EPOC y bajo BMI.

#### *Objetivo específico*

Evaluar el funcionalismo de la cadena respiratoria mitocondrial y el estado redox en el cuádriceps de pacientes con EPOC BMI<sub>N</sub>, EPOC BMI<sub>L</sub> y sujetos sanos sedentarios.





MANUSCRITO I

---

## Reduced Muscle Redox Capacity after Endurance Training in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease

ROBERTO A. RABINOVICH, ESTHER ARDITE, THIERRY TROOSTERS, NEUS CARBÓ, JULI ALONSO, JOSÉ MANUEL GONZALEZ DE SUSO, JORDI VILARÓ, JOAN ALBERT BARBERÀ, MAITE FIGUERAS POLO, JOSEP M. ARGILÉS, JOSÉ C. FERNANDEZ-CHECA, and JOSEP ROCA

Servei de Pneumologia (ICPCT) and Liver Unit (IMD) and CSIC, Hospital Clinic, Facultat de Medicina, IDIBAPS, and Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona; Faculty of Physical Education and Physiotherapy, KUL, Leuven, Belgium; EUIF Blanquerna, Universitat Ramon Llull, Barcelona; Centre Diagnostic Pedralbes, Barcelona; and Centre d'Alt Rendiment, Sant Cugat del Vallès, Barcelona, Spain

---

*(Received in original form March 13, 2001; accepted in final form July 5, 2001)*

Supported by Grants FIS 99/0029 and 00/0281 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias; E-Remedy (IST-2000-25146) from the European Union (DG XIII); and, Comissionat per a Universitats i Recerca de la Generalitat de Catalunya (1999 SGR 00228).

Drs. Rabinovich and Troosters were Research Fellows supported by the European Respiratory Society, 2000.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Josep Roca, MD, Servei de Pneumologia, Hospital Clínic, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain. E-mail: jroca@clinic.ub.es

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

Am J Respir Crit Care Med Vol 164, pp 1114–1118, 2001  
Internet address: [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org)

**The present study was undertaken to test whether endurance training in COPD patients, along with enhancement of muscle bioenergetics, decreases muscle redox capacity as a result of recurrent episodes of cell hypoxia induced by high intensity exercise sessions. Seventeen COPD patients (FEV<sub>1</sub> 38±4 % pred; PaO<sub>2</sub> 69±2.7 mmHg; PaCO<sub>2</sub> 42±1.7 mmHg) and five age-matched controls (C) were studied pre- and post-training. Reduced (GSH) and oxidized (GSSG) gluta-**

**thione, lipid peroxidation, and gamma-glutamyl cysteine synthase heavy subunit chain mRNA expression ( $\gamma$ GCS-HS mRNA) were measured in the vastus lateralis. Pre-training redox status at rest and after moderate (40%  $W_{peak}$ ) constant-work rate exercise were similar between groups. After training ( $\Delta W_{peak}$ ,  $27 \pm 7\%$  and  $37 \pm 18\%$ , COPD and C, respectively) ( $p < 0.05$  each), GSSG levels increased only in COPD patients (from  $0.7 \pm 0.08$  to  $1.0 \pm 0.15$  nmol/mg protein,  $p < 0.05$ ) with maintenance of GSH levels, whereas GSH markedly increased in C (from  $4.6 \pm 1.03$  to  $8.7 \pm 0.41$  nmol/mg prot,  $p < 0.01$ ). Post-training  $\gamma$ GCS-HS mRNA levels increased after submaximal exercise in COPD patients. No evidence of lipid peroxidation was observed. We conclude that while endurance training increased muscle redox potential in healthy subjects, COPD patients showed a reduced ability to adapt to endurance training reflected in lower capacity to synthesize GSH.**

**Keywords:** COPD; Glutathione; Muscle dysfunction; Endurance training; Oxidative stress.

## INTRODUCTION

Oxidative stress is a dynamic process that reflects an imbalance between pro-oxidant and antioxidant factors in favor of the former (1). Reduced glutathione (GSH), the most abundant non-protein thiol in cells, plays a prominent role in the regulation of this delicate balance by quenching reactive oxygen species (ROS), aimed to maintain an appropriate cellular redox environment (1;2). GSH is synthesized exclusively in the cytosol by two sequential enzymatic steps, although it is also found in mitochondria where it plays a pivotal role in maintaining vital mitochondrial functions (3).

It has been recently reported that patients with pulmonary emphysema substantiated by CT-scan show decreased muscle antioxi-

dant potential as indicated by low GSH levels in muscle at rest (4). During exercise, patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) show higher peripheral blood [ROS] and higher oxidized glutathione (GSSG) levels than healthy subjects (5;6). These phenomena are partially reversed when patients exercise while breathing high  $O_2$  concentrations (5) and after pre-treatment with allopurinol, a xanthine oxidase inhibitor (7). It has been suggested that muscle oxidative stress generated during exercise might be a key mechanism of the peripheral muscle dysfunction described in COPD patients (4;8;9).

Endurance training enhances muscle  $O_2$  transport/ $O_2$  utilization capability resulting in increased exercise performance both in patients with COPD (10) and in healthy sedentary subjects (10;11). We hypothesize, however, that high intensity exercise training increases muscle oxidative stress in COPD patients possibly due to inability to cope with an increased muscle ROS production. The phenomenon could be attributed to high oxygen utilization rate in mitochondrial respiratory chain (12) or by recurrent episodes of cellular hypoxia throughout the training period. Under these conditions, hypoxia is recognized as a trigger of ROS generation from different sources including the mitochondrial respiratory chain (13) or extra-mitochondrial sources such as the xanthine oxidase system (7).

The characterization of this putative phenomenon may be of relevance in the modification of training patterns, and more importantly, its analysis may shed light on the nature of skeletal muscle dysfunction in these patients (8).

The present investigation was designed to examine the effects of exercise training on limb muscle redox status in a group of COPD patients representative of a large spectrum of severity of the disease and in healthy sedentary age-matched controls. To this end, reduced glutathione, GSSG, lipid peroxidation, and gamma-glutamyl cysteine synthase heavy subunit chain mRNA expression ( $\gamma$ GCS-HS mRNA) in muscle specimens obtained



from a needle biopsy of the “*vastus lateralis*” were measured, both at rest and after moderate intensity constant-work rate exercise, before and after an eight-week highly controlled exercise training program with cycloergometer.

## METHODS

### Study group

Seventeen clinically stable COPD patients (all men) (**Table 1**) (14) free of oral steroids were studied. Five healthy sedentary subjects were recruited to serve as controls.

### Study design

Selection procedures for inclusion in the study were: a) clinical assessment; b) pulmonary function testing at rest (Jaeger, MasterScreen; Würzburg, Germany) (15;16); c) chest X-ray film; d) general blood analysis; and, e) standard incremental exercise testing. Training-induced physiological changes were measured with exercise tolerance and half-time phosphocreatine ([PCr]) recovery with 31-phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy ( $^{31}\text{P}$ -NMRS). In all the subjects (17 COPD patients and 5 controls), a needle muscle biopsy of the “*vastus lateralis*” was obtained immediately after a moderate intensity (40% pre-training  $W_{\text{peak}}$ ) constant-work rate protocol. In a subset of twelve COPD patients and in all five controls, an additional pre-training muscle biopsy was done at rest, before the submaximal constant-work rate protocol. After training, the muscle biopsy at rest was obtained only in eight of the COPD patients and in all five controls.

All subjects trained five days per week during eight weeks. Training sessions were split into small blocks of 2-5 min of high intensity continuous cycling (at approximately 90% of the  $W_{\text{peak}}$  at the end of the training program) for at least an effective period of 30 min.

**TABLE 1. CHARACTERISTICS OF THE STUDY GROUP**

	COPD			Healthy		
	Mean	±	SEM	Mean	±	SEM
<b>Age,yr</b>	<b>66</b>	±	<b>1.3</b>	<b>62</b>	±	<b>2.7</b>
<b>Weight,Kg</b>	<b>72</b>	±	<b>4.5</b>	<b>75</b>	±	<b>1.3</b>
<b>BMI,kg/m<sup>2</sup></b>	<b>25.3</b>	±	<b>1.4</b>	<b>26.5</b>	±	<b>1</b>
<b>FEV<sub>1</sub>,L</b>	<b>1.13</b>	±	<b>0.13</b>	<b>3.29</b>	±	<b>0.34<sup>‡</sup></b>
<b>FEV<sub>1</sub>,% pred</b>	<b>38</b>	±	<b>4</b>	<b>105</b>	±	<b>11<sup>†</sup></b>
<b>FVC,% pred</b>	<b>66</b>	±	<b>5</b>	<b>104</b>	±	<b>14*</b>
<b>TLC,% pred</b>	<b>104</b>	±	<b>5</b>	<b>95</b>	±	<b>7</b>
<b>FRC,% pred</b>	<b>139</b>	±	<b>10</b>	<b>91</b>	±	<b>4<sup>†</sup></b>
<b>RV/TLC,%</b>	<b>156</b>	±	<b>6.5</b>	<b>80</b>	±	<b>5<sup>†</sup></b>
<b>PaO<sub>2</sub>,mmHg</b>	<b>69</b>	±	<b>2.7</b>	<b>100</b>	±	<b>3.6<sup>‡</sup></b>
<b>PaCO<sub>2</sub>,mmHg</b>	<b>42</b>	±	<b>1.7</b>	<b>35</b>	±	<b>1.5<sup>‡</sup></b>

Definition of abbreviations: BMI=body mass index; RV/TLC,%=residual volume to total lung capacity as actual percentage (RV/TLC,%).

\*  $p < 0.05$ , Student's unpaired t test.

†  $p < 0.01$ , Student's unpaired t test.

‡  $p < 0.001$ , Student's unpaired t test.

### Exercise testing

**Incremental exercise.** After three minutes of unloaded pedaling (CardiO<sub>2</sub> cycle Medical Graphics Corporation, St. Paul, Mn), the work rate was increased by 5 or 10 Watts per minute. Arterial blood samples (Seldicath, Plastimed, Saint-Leu-La-Foret, France) were taken every three minutes throughout the test to analyze blood gases and lactate (Ciba Corning 800, Medfield, MA, USA).

**Half-time [PCr] recovery.** Exercise tests during  $^{31}\text{P}$ -NMRS measurements were performed using an ergometer made of non-magnetic materials designed to fit into a standard whole body magnet (17).

## Muscle biopsies

A muscle sample (150 mg) was obtained from the “*vastus lateralis*” using a Bergström needle. Half of the sample was included in Krebs’ buffer (pH 7.40) solution for immediate processing, and the remaining material was frozen in liquid nitrogen and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ .

The two molecular forms of glutathione, *GSH* and *GSSG*, were determined in the homogenate by high-performance liquid chromatography (HPLC) (18). *Lipid peroxidation* was assessed using cis-parinaric acid (CPA), a naturally fluorescent aliphatic acid containing four double bonds. This aliphatic acid incorporates readily into membranes and the loss of fluorescence upon damage of these double bonds by oxidants and reactive species monitors membranes damage as described in (19;20).

*Gamma glutamyl cysteine synthase heavy sub-unit chain mRNA expression ( $\gamma\text{GCS-HS mRNA}$ )* was measured by RT-PCR method (21). Values for  $\gamma\text{GCS-HS mRNA}$  were corrected by 18S mRNA and expressed as  $\gamma\text{GCS-HS}/18\text{S mRNA}$ .

## Data analysis

Results are expressed as mean $\pm$ SEM. Training effects within groups were analyzed using Student paired-t test. Comparisons between groups were made using Student unpaired-t test or ANOVA. Pearson regression analysis was used when required. A p-value lower than 0.05 was taken as statistically significant.

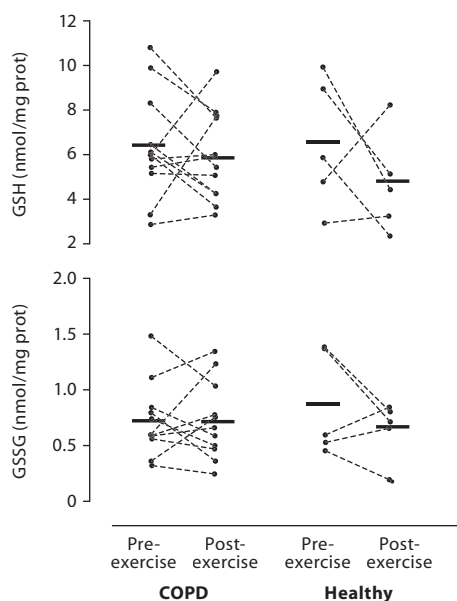
## RESULTS

Anthropometric characteristics and lung function in both patients and controls are indicated in **Table 1**. Group mean values for age and body mass index (BMI) were similar between COPD patients and controls. On average, patients showed a severe obstructive ventilatory defect, but encompassed a large spectrum of severity

of the disease (FEV<sub>1</sub> from 15 to 66% pred; PaO<sub>2</sub> from 52 to 89 mmHg, and BMI from 15.0 to 38.8 kg/m<sup>2</sup>).

As expected, peak exercise tolerance was severely reduced in COPD patients compared to controls ( $48\pm 6.6$  vs  $124\pm 14$  W, respectively,  $p<0.01$ ). While COPD patients showed reduced ventilatory reserve ( $V_{E\text{peak}}$ ,  $91\pm 7$  %MVV), but preserved HR reserve ( $\text{HR}_{\text{peak}}$ ,  $82\pm 3$  %HRmax pred.), the control group displayed normal values for these two variables ( $67\pm 8$ % and  $94\pm 5$ %, respectively). At peak exercise, PaO<sub>2</sub> did not change ( $-4\pm 3.0$  mmHg) and PaCO<sub>2</sub> slightly increased ( $2\pm 4.8$  mmHg) ( $p<0.001$ ) in COPD patients. It is of note, however, that eleven out of the 17 patients showed exercise-induced PaO<sub>2</sub> fall ( $-11.36\pm 2$  mmHg) at  $W_{\text{peak}}$ . The COPD group showed early increase in arterial lactate levels ([La]) (22), but [La] at peak exercise was lower in COPD patients (5.4 mmol/L) than in controls (10.8 mmol/L).

*Muscle redox status at rest and after constant-work rate exercise.* No differences between COPD patients and controls were seen in the resting levels of glutathione (*GSH* and *GSSG*) in the pre-training study (**Figure 1**). Consistent with this, no changes in cis-parinaric acid were found between groups (data not shown). Eleven minutes of moderate intensity constant-work rate exercise did not generate statistically significant changes (post- minus pre-exercise) in: 1) total glutathione levels ( $-2.11 \pm 1.8$  nmol/mg prot and  $-0.32\pm 0.9$  nmol/mg prot, controls (n= 5) and COPD patients (n= 12), respectively); and 2) lipid peroxidation index. Likewise, no differences in these variables were seen from rest to moderate exercise after training in the two groups (8 COPD patients and 5 controls).



**FIGURE 1.** Individual and mean group effects of submaximal exercise on muscle redox status. Reduced glutathione (GSH) ( $n=12$  and  $5$ , patients and controls respectively), upper panel, and oxidized glutathione (GSSG) ( $n=11$  and  $5$ , patients and controls respectively), lower panel, measured at rest (Pre-exercise) and after moderate intensity (40% pre-training  $W_{peak}$ ) constant-work rate exercise (Post-exercise) in COPD patients and in controls before training. No differences at rest and after exercise were found between patients and controls. GSSG was not assessed in one patient due to technical problems.

### Effects of endurance training

Physiologic training effects (**Table 2**) were shown at peak exercise in COPD patients ( $\Delta W_{peak}$   $27\pm 7\%$ ,  $p<0.001$ ;  $\Delta VO_{2,peak}$   $9\pm 4\%$ ,  $p<0.05$ ) and in healthy subjects ( $\Delta W_{peak}$   $37\pm 18\%$ ,  $p=0.07$ ;  $\Delta VO_{2,peak}$   $15\pm 4\%$ ,  $p<0.05$ ). Both [La] at iso-work rate and half-time [PCr] recovery significantly fell after training (**Table 2**). The impact of the training program on  $W_{peak}$  and whole-body  $VO_{2,peak}$  was lower in COPD patients than in controls, whereas train-

ing-induced effects on skeletal muscle ([La] at iso-work rate and half-time [PCr] recovery) were similar between groups.

*Changes in muscle redox status (17 COPD patients and 5 controls).* The levels of GSH and total glutathione (GSH+GSSG) remained unchanged in COPD patients after endurance training, although a moderate increase in GSSG levels was observed ( $\Delta GSSG$ , from  $0.70\pm 0.08$  to  $1.0\pm 0.15$  nmol/mg prot,  $p=0.05$ ) (**Figure 2**). In contrast, training in healthy subjects increased reduced glutathione substantially ( $\Delta GSH$ , from  $4.60\pm 1.03$  to  $8.70\pm 0.41$  nmol/mg prot,  $p<0.01$ ); and, consequently, so did total glutathione ( $\Delta total$  glutathione, from  $5.20\pm 1.09$  to  $9.50\pm 0.48$  nmol/mg prot,  $p<0.05$ ). No increase in lipid peroxidation from pre- to post-training (from  $398\pm 93$  to  $397\pm 52$  AU, and from  $397\pm 72$  to  $500\pm 85$  AU, patients and controls respectively) was observed. Moreover, while healthy subjects showed a correlation between post-training  $\Delta W_{peak}$  and  $\Delta GSH$ , the COPD group presented an association between  $\Delta W_{peak}$  and  $\Delta GSSG$ , as displayed in **Figure 3**.

Post-training  $\gamma GCS-HS$  mRNA expression (**Figure 4**) showed a trend to fall in healthy subjects, while a tendency to rise was seen in COPD patients. Moreover, post-training induction of  $\gamma GCS-HS$  mRNA expression reaching statistical significance (post-minus pre-exercise difference in the post-training study:  $249\pm 115$   $\gamma GCS-HS/18S$  mRNA,  $p<0.05$ ) was observed after submaximal exercise in COPD patients, but not in healthy sedentary subjects. A strong correlation was seen between training induced fall in  $\gamma GCS-HS$  mRNA expression and post-training increase in GSH ( $r=-0.95$ ,  $p<0.01$ ) in controls.

Muscle biopsies obtained at rest ( $8$  COPD patients and  $5$  controls) did not show changes in the redox status from pre- to post-training in GSH (from  $5.7\pm 0.53$  to  $5.1\pm 0.65$ ; and, from  $6.5\pm 1.30$  to  $8.7\pm 1.20$  nmol/mg prot, patients and controls, respectively), in GSSG, nor in total GSH in the two groups.

**TABLE 2. EFFECTS OF TRAINING ON EXERCISE TOLERANCE AND MUSCLE BIOENERGETICS**

		COPD			Healthy		
		Mean	±	SEM	Mean	±	SEM
<b>Wpeak,watts</b>	Pre	48	±	6.5	124	±	14
	Post	62	±	8.9	160	±	6.4
	Δ Post-Pre	14	±	3.3***	36	±	14*
<b>VO<sub>2</sub> peak,L/min</b>	Pre	1.11	±	0.11	1.76	±	0.56
	Post	1.22	±	0.12	2.02	±	0.10
	Δ Post-Pre	0.10	±	0.04*	0.26	±	0.07*
<b>[La] iso-W,mmol/L</b>	Pre	5.1	±	1.11	10.3	±	1.06
	Post	4.0	±	1.13	7.1	±	1.05
	Δ Post-Pre	-1.3	±	1.07 <sup>†</sup>	-1.5	±	1.04 <sup>†</sup>
<b>Half-time [PCr] recovery, seconds</b>	Pre	56	±	3	43	±	5
	Post	44	±	3	31	±	4
	Δ Post-Pre	-12	±	3.3 <sup>†</sup>	-12	±	2.0*

**Table 2.** Definition of abbreviations: Wpeak = peak work rate; Vo<sub>2</sub> peak = peak oxygen uptake; 100% of pretraining Wpeak, [La] iso-W = arterial lactate at iso-work rate; half-time [PCr] recovery = half-time phosphocreatine recovery.

Post-minus pretraining differences were analyzed using Student's paired t test:

\* p < 0.05.

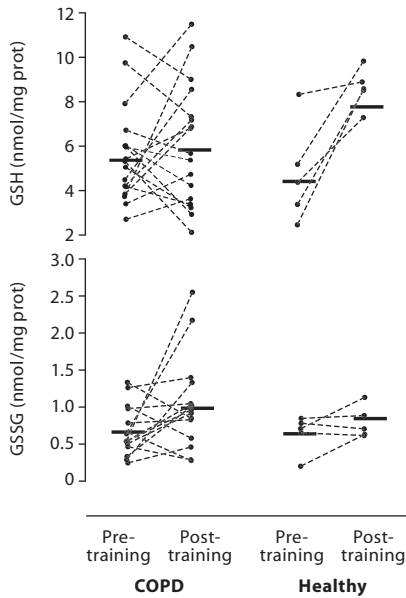
† p < 0.01.

‡ p < 0.001.

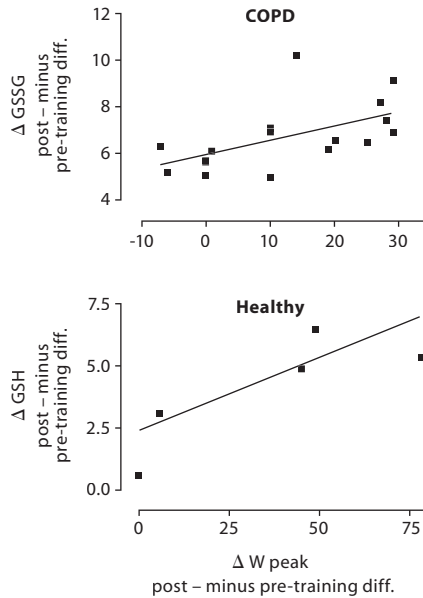
**Figure 2.** Individual and mean group effects of training on muscle redox status. Reduced glutathione (GSH, upper panel) (n=17 and 5, patients and controls respectively) and oxidized glutathione (GSSG, lower panel) (n=16 and 5, patients and controls respectively). Data correspond to measurements after constant-work rate exercise. COPD patients increased GSSG after training without changes in GSH. In contrast, healthy sedentary subjects, markedly increased GSH with no changes in GSSG. GSSG was not assessed in one patient due to technical problems.

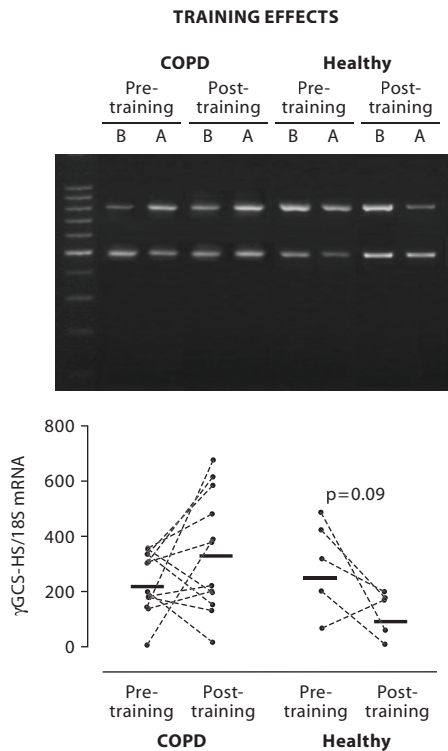
**Figure 3.** Relationships between post-training increase in exercise performance and muscle redox status. Post-training increase in peak work rate (ΔWpeak) was correlated with the rise in oxidized glutathione (ΔGSSG) in COPD patients (upper panel, n=16) and it was associated with the increase in reduced glutathione (ΔGSH) in healthy subjects (lower panel, n=5). GSSG was not assessed in one patient due to technical problems.

**FIGURE 2.**



**FIGURE 3.**





**Figure 4.** Representative RT-PCR of  $\gamma$ GCS-HS mRNA and 18S mRNA ribosomal subunit expression. COPD patients and healthy controls pre-training (pre-training) and post-training (post-training), both before (B) and after (A) constant-work rate exercise (upper panel). Effects of training on  $\gamma$ GCS-HS mRNA expression in COPD patients and control subjects (lower panel) ( $n=12$  and  $5$ , patients and controls respectively).

## DISCUSSION

The ability of mammalian cells to maintain cellular functions during oxidative stress depends on the induction of protective antioxidant systems. In this regard, GSH plays a recognized key role in quenching a varied repertoire of reactive species, which otherwise may compromise cell functions (1;2). Since the cellular steady-state level of GSH reflects a balance between its synthesis and its utilization in the elimination of reactive oxygen species, the present study has characterized the regulation of GSH as a reflect of oxidative stress in skeletal muscle following a prolonged training period in healthy controls and COPD patients. Our findings indicate a divergent ability of the two groups to adapt the redox system to the cellular demand for  $O_2$  transport and consumption during training. While healthy controls markedly increased muscle GSH levels after prolonged training, the levels of GSH homeostasis in skeletal muscle of COPD patients did not undergo significant changes except for the GSSG increase detected after the training period. Despite these divergent findings, there was a lack of lipid peroxidation common for both groups, suggesting absence of significant deleterious consequences of oxidative stress after endurance training in both COPD patients and controls.

Despite the fact that the  $\gamma$ GCS-HS mRNA levels showed a trend to decrease ( $p=0.09$ ), healthy sedentary subjects adapt to the demand of exercise training by doubling the cellular levels of GSH. The negative correlation between the  $\Delta$ GSH and the fall in  $\gamma$ GCS-HS mRNA levels ( $r= -0.95$ ) after training is an intriguing finding; and although we do not understand the mechanisms mediating this inverse relation, we postulate that during a prolonged stimuli (eight weeks of training), the rise in GSH may signal the repression of  $\gamma$ GCS-HS mRNA. On the other hand, we attempted to characterize the regulation of GSH at the molecular level by determining the mRNA levels of the  $\gamma$ GCS-HS, but the lack

of measurement of its enzymatic activity due to the insufficient size of muscle sample limits the interpretation of our findings.

The resting muscle biopsies carried out in eight COPD patients and in all five controls pre- and post-training did not display changes in the redox system. These results seem to suggest therefore that the findings alluded to above are only evident after exercise.

It is well accepted that strenuous exercise induces higher levels of oxidative stress in COPD patients than in normal subjects (5). The phenomenon can be inhibited by treatment with xanthine oxidase inhibitors (allopurinol) (7) and by oxygen therapy (5). In the present study, the lack of changes in the redox system after constant-work rate exercise both in COPD patients and in controls (**Figure 1**) can be ascribed to the moderate intensity (40% pre-training  $W_{peak}$ ) exercise. Both intensity and duration of the protocol were chosen to perform the measurements after steady state exercise.

### Training effects and muscle redox status

COPD patients as well as healthy sedentary subjects, significantly enhanced exercise tolerance, a phenomenon dependent on training-induced improvement of muscle  $O_2$  transport and utilization (8). It is of note that post-training values of half-time [PCr] recovery in COPD patients were equivalent to the pre-training results in controls (10) (**Table 2**). The present study confirms that in COPD patients (10), training effects on skeletal muscle in COPD patients ( $-\Delta$ half-time [PCr] recovery and  $-\Delta$ [La]<sub>iso-w</sub>) were noticeably higher than those observed at whole-body level ( $\Delta W_{peak}$  and  $\Delta VO_{2peak}$ ), a finding that may be of relevance in the evaluation of training outcomes.

In these patients, the reserve of the central organs to increase convective  $O_2$  transport (arterial oxygen content times blood flow) during heavy exercise (8;10) is limited by: 1) the severity of lung function impairment; and, 2) the

effects of pleural pressure swings on cardiac output ( $\Delta V_E$  and  $\Delta Q_{T_r}$ , respectively) (23;24). The phenomena alluded to, along with concurrent peripheral factors, such as impaired muscle oxygen conductance from capillary to mitochondria (25;26), are prone to induce cell hypoxia during moderate to high intensity exercise and consequently oxidative stress. Increased activity of cytochrome oxidase (COX) and up-regulation of this enzyme (27) can be interpreted as mitochondrial adaptations to cell hypoxia.

### Oxidative stress and muscle wasting

Engelen et al. (9) have speculated on a causal relationship between abnormally low muscle redox potential at rest and the alterations of protein metabolism observed in patients with emphysema substantiated by CT-scan (4). Despite the fact that the present study did not identify baseline differences in GSH levels between healthy subjects and COPD patients, our results are not in conflict with those reported by these investigators (4) since we purposely studied an heterogeneous group of COPD patients encompassing a large spectrum of severity of the disease.

In summary, the study demonstrates differences in training-induced adaptations of muscle redox status between COPD patients and controls. While healthy sedentary subjects increased muscle GSH levels after training, COPD patients reduced their redox potential. Our results highlight the importance of training-induced peripheral adaptations and its relevance in the assessment of training outcomes in COPD patients. Whether oxidative stress is a central factor mediating muscle mass wasting, particularly in susceptible subsets of COPD patients in whom a true myopathy can be observed remains to be elucidated.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Felip Burgos, Conxi Gistau and Jose Luis Valera and all the technical staff of the Lung Function Laboratory for their skillful support during the study. Anna Capitán, Cristina Gonzalez and Eduard Vilar from EUIF Blanquerna are acknowledged for their outstanding work supervising the training sessions. We thank Carme Hernandez, coordinator nurse of the Home Care Unit, for her support in the logistics of the study. Finally, the authors acknowledge the material support received from Erich Jaeger to conduct the study.

## REFERENCES

1. Meister A, Anderson M. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983;52:711-760.
2. Fernandez Checa JC, Ookthens M. Regulation of hepatic GSH. In: N. Tavoloni and P. Berk, editors. Hepatic anion transport and bile secretion physiology and pathophysiology. New York, Raven Press ed. 1993, p. 345-395
3. Fernandez Checa JC, Kaplowitz N, García-Ruiz C, Colell A. Mitochondrial glutathione: importance and transport. *Semin Liver Dis* 1998;18:389-401.
4. Engelen MPKJ, Schols AMWJ, Does JD, Deutz NEP, Wouters EF. Altered glutamate metabolism is associated with reduced muscle glutathione levels in patients with emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:98-103.
5. Viña J, Servera E, Asensi M, Sastre J, Pallardó FV, Ferrero JA, Asunción JGI, Antón V, Marín J. Exercise causes blood glutathione oxidation in chronic obstructive pulmonary disease: prevention by O<sub>2</sub> therapy. *J Appl Physiol* 1996;81:2199-2202.
6. Sastre J, Asensi M, Gascó E, Pallardó FV, Ferrero JA, Furukawa T, Viña J. Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol* 1992;263:R992-R995.
7. Heunks L, Viña MJ, Van Herwaarden CL, Folgering HT, Gimeno A, Dekhuijzen PN. Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol* 1999;277:R1697-R1704.
8. American Thoracic Society and European Respiratory Society. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159 (Suppl):S1-S40.
9. Engelen MPKJ. Muscle wasting in COPD: a metabolic and functional perspective. Maastricht: University Hospital.; 2001. Doctoral Thesis
10. Sala E, Roca J, Marrades RM, Alonso J, Gonzalez de Suso JM, Moreno A, Barbera JA, Nadal J, Jover L, Rodriguez-Roisin R, Wagner PD. Effects of endurance training on skeletal muscle bioenergetics in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1726-1734.
11. Roca J, Agustí AGN, Alonso A, Barberà JA, Rodriguez-Roisin R, Wagner PD. Effects of training on muscle O<sub>2</sub> transport at VO<sub>2</sub>max. *J Appl Physiol* 1992;73:1067-1076.
12. Fernandez Checa JC, García-Ruiz C, Colell A, Morales A, Mari M, Miranda M, and Ardite E. Oxidative stress: role of mitochondria and protection by glutathione. *Biofactors* 1998;8:7-11.
13. Chandel NS, Schumacker PT. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J Appl Physiol* 2000;88:1880-1889.
14. A.T.S. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152 (Suppl.):S78-S121.
15. Roca J, Burgos F, Sunyer J, Saez M, Chinn S, Antó JM, Rodriguez-Roisin R, Quanjer Ph H, Nowak D, Burney P. Reference values for forced spirometry. *Eur Respir J* 1998;11:1354-1362.
16. Roca J, Burgos F, Barberà JA, Sunyer J, Rodriguez-Roisin R, Castellsagué J, Sanchis J, Antó JM, Casan P, Clausen JL. Prediction equations for plethysmographic lung volumes. *Respir. Med* 1998;92:454-460.
17. Gonzalez de Suso JM, Bernús G, Alonso A, Alay A, Capdevila A, Gili J, Prat JA, Arús C. Development and characterization of an ergometer to study the bioenergetics of the human quadriceps muscle by <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy inside a standard NMR scanner. *Magn Reson Med* 1993;29:575-581.
18. Fariss MW, Reed DJ. High-performance liquid chromatography of thiols and disulfides: dinitrophenol derivatives. *Methods Enzymol* 1987;143:101-109.
19. Hedley D, Chow S. Flow cytometric measurement of lipid peroxidation in vital cells using parinaric acid. *Cytometry* 1992;13:686-692.
20. Steenbergen RH, Drummen GP, Op den Kamp JA, Post JA. The use of cis-parinaric acid to measure lipid peroxidation in cardiomyocytes during ischemia and reperfusion. *Biochim Biophys Acta* 1997;1330:127-137.
21. Ardite E, Sans M, Panes J, Romero FJ, Pique JM, Fernandez Checa JC. Replenishment of glutathione levels improves mucosal function in experimental acute colitis. *Lab Invest* 2000;80:734-744.

22. Maltais F, Simard AA, Simard C, Jobin, Desgagnes P, Leblanc P. Oxidative capacity of the skeletal muscle and lactic acid kinetics during exercise in normal subjects and in patients with COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:288-293.
23. Sciurba FC, Rogers RM, Keenan RJ, Slivka, Gorcsan III J, Ferson PF, Holbert JM, Brown ML, Landreneau RJ. Improvement in pulmonary function and elastic recoil after lung-reduction surgery for diffuse emphysema. *N Engl J Med* 1996;334:1095-1099.
24. Montes de Oca M, Rassulo J, Celli BR. Respiratory muscle and cardiopulmonary function during exercise in very severe COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1284-1289.
25. Richardson RS, Noyszewski EA, Kendrick KF, Leigh JS, Wagner PD. Myoglobin O<sub>2</sub> desaturation during exercise: Evidence of limited O<sub>2</sub> transport. *J Clin Invest* 1995;96:1919-1926.
26. Jobin J, Maltais F, Doyon JF, Leblanc P, Simard PM, Simard AA. Chronic obstructive pulmonary disease: capillarity and fiber characteristics of skeletal muscle. *J Cardiopulm Rehabil* 1998;18:432-437.
27. Sauleda J, García-Palmer F, Wiesner RJ, Tarraga S, Harting I, Tomás P, Gómez C, Saus C, Palou A, Agustí AGN. Cytochrome oxidase activity and mitochondrial gene expression in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1413-1417.



## MANUSCRITO II

## Training Depletes Muscle Glutathione in COPD Patients with Low Body Mass Index

Roberto A Rabinovich<sup>(1)</sup>, Esther Ardite<sup>(1)</sup>, Ana Maria Mayer<sup>(1)</sup>, Maite Figueras Polo<sup>(2)</sup>, Jordi Vilaró<sup>(3)</sup>, Josep M. Argilés<sup>(2)</sup>, And Josep Roca<sup>(1)</sup>

Servei de Pneumologia (ICPCT), Hospital Clínic, Facultat de Medicina, IDIBAPS: Villarroel 170, 08036-Barcelona, Spain<sup>(1)</sup>; Cancer Research Group, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona: Diagonal 645, 08028-Barcelona, Spain<sup>(2)</sup>; and, EU IF Blanquerna. Universitat Ramon Llull: Padilla 326-332, 08025-Barcelona, Spain<sup>(3)</sup>

Supported by Grants FIS 00/0281 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias; E-Remedy (IST-2000-25146) from the European Union; Comissionat per a Universitats i Recerca de la Generalitat de Catalunya (1999 SGR 00228); and Red Respira C03/011.

Roberto A Rabinovich was a Research Fellows supported by the European Respiratory Society, 2000. Ana Maria Mayer was Research Fellow supported by Fundación CAPES, Brasil, 2001-02.

Correspondence: Roberto Rabinovich, MD. Servei de Pneumologia. Hospital Clínic. Villarroel 170. Barcelona 08036. Spain. Phone 34-93-227-5540; FAX 34-93-227-5455; E-mail: rrabinov@clinic.ub.es

**Abstract:** Physiological increase of muscle glutathione after training is not seen in COPD patients indicating abnormal peripheral muscle adaptations to exercise. We hypothesized that oxidative stress is primarily associated with low body mass index (BMI). Eleven patients with preserved BMI ( $BMI_N$ :  $28.2 \pm 1.2$  kg.m<sup>-2</sup>), nine patients with low BMI ( $BMI_L$ :  $19.7 \pm 0.60$  kg.m<sup>-2</sup>) and five age-matched controls (C:  $26.5 \pm 0.9$  kg.m<sup>-2</sup>) were studied before and after eight weeks of high-intensity endurance training. Reduced glutathione (GSH) and gamma-glutamyl cysteine synthase heavy subunit chain mRNA expression ( $\gamma$ GCS-HS mRNA) were measured in the *vastus lateralis*. After training, exercise capacity increased ( $\Delta VO_{2peak}$ ,  $13 \pm 5.2\%$ ;  $10 \pm 5.6\%$ ; and,  $15 \pm 4.3\%$ ,  $BMI_L$ ,  $BMI_N$  and C, respectively) ( $p < 0.05$  each). GSH levels decreased in  $BMI_L$  (from  $5.2 \pm 0.7$  to  $3.7 \pm 0.8$  nmol/mg protein,  $\Delta GSH$   $-1.5 \pm 0.7$  nmol/mg prot,  $p < 0.05$ ); no changes were seen in  $BMI_N$  (from  $5.4 \pm 0.7$  to  $6.7 \pm 0.9$  nmol/mg protein,  $\Delta GSH$   $1.3 \pm 0.9$  nmol/mg protein), whereas GSH markedly increased in C (from  $4.6 \pm 1$  to  $8.7 \pm 0.4$  nmol/mg prot,  $\Delta GSH$   $4.1 \pm 1$  nmol/mg prot,  $p < 0.01$ ).  $\Delta GSH$  in  $BMI_L$  was different from  $\Delta GSH$  in  $BMI_N$  and C ( $p < 0.05$ , each). Consistent changes were observed in  $\gamma$ GCS-HS mRNA expression. We conclude that GSH depletion after training in  $BMI_L$  may suggest that oxidative stress plays a key role on muscle wasting in COPD.

## INTRODUCTION

In the last few years, systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) <sup>(1;2)</sup> are receiving a great deal of attention partly because of the impact of muscle wasting on poor disease prognosis <sup>(3)</sup>. The underlying mechanisms of weight loss are, however, incompletely understood. We have recently reported <sup>(4)</sup> that COPD patients show an abnormal regulation of skeletal muscle glutathione (GSH). While high-intensity endurance training markedly enhanced antioxidant buffering in healthy subjects by a two-fold increase in muscle GSH, COPD patients showed a post-training increase of oxidized glutathione (GSSG) without changes in GSH. Impaired regulation of redox potential in the patients was closely related with the gain in exercise capacity produced by training <sup>(4)</sup>. These results suggest that antioxidant buffering was not adapted to the higher rate of exercise-induced reactive oxygen species (ROS) production in COPD (4-6), thus leaving skeletal muscles more susceptible to oxidative stress.

We hypothesize that oxidative stress might be a central factor in the complex mechanisms of skeletal muscle wasting shown by COPD patients with low body mass index (BMI<sub>L</sub>) <sup>(7)</sup>. A better understanding of the underlying processes may have practical implications to refine evidence-based therapeutic strategies such as rehabilitation/training <sup>(8)</sup>. The current investigation explores the relationships between abnormal training-induced GSH response and muscle wasting in COPD. To this end, we expanded the study group reported in <sup>(4)</sup> to compare COPD patients with preserved BMI (BMI<sub>N</sub>), BMI<sub>L</sub> and age-matched healthy sedentary controls (C).

## METHODS

### Study Group

Twenty clinically stable COPD patients (all men) <sup>(9)</sup> free of oral steroids were included in the study. Five healthy sedentary subjects were recruited to serve as controls (BMI 26.5±0.9 kg.m<sup>2</sup>). Eleven out of the twenty COPD patients (BMI<sub>N</sub>: 28.2±1.2 kg.m<sup>2</sup>) showed preserved body mass index, whereas the remaining nine patients had low BMI (BMI<sub>L</sub>: 19.7±0.60 kg.m<sup>2</sup>). Up to seventeen patients and all five controls were included in <sup>(4)</sup>. All participants signed the written informed consent approved by the Committee on Investigations involving Human Subjects at the Hospital Clínic, Universitat de Barcelona.

### Study design

Selection procedures for inclusion in the study were: a) clinical assessment; b) pulmonary function testing at rest (Jaeger, MasterScreen; Würzburg, Germany) (10;11); c) chest X-ray film; d) general blood analysis; and, e) standard incremental exercise testing. Training-induced physiological changes were measured by changes in exercise tolerance. In all the subjects (20 COPD patients and 5 controls), a needle muscle biopsy of the “*vastus lateralis*” was obtained immediately

after eleven minutes of moderate intensity (40% pre-training  $W_{peak}$ ) constant-work rate protocol before and after 8 weeks of endurance training.

Training sessions were of 60 min duration and split into small blocks of 2 to 5 min of high intensity continuous cycling (60 cycles per minute) (at approximately 90% of the  $W_{peak}$  at the end of the training program) for at least an effective period of 30 min. Recovery time between the high intensity periods consisted in cycling at the same speed and under 60% of pre-training  $W_{peak}$ . The first week was used as an adaptation period where the high intensity blocks were initially of 60% of  $W_{peak}$ . After that, the work level has been raised to reach values close to the 90 % pre-training  $W_{peak}$  and this intensity level was maintained until the end of the training period.

### Exercise testing

*Incremental exercise.* After three minutes of unloaded pedaling (CardiO<sub>2</sub> cycle Medical Graphics Corporation, St. Paul, Mn), the work rate was increased by 5 or 10 Watts per minute. Arterial blood samples (Seldicath, Plastimed, Saint-Leu-La-Forêt, France) were taken every three minutes throughout the test to analyze blood gases and lactate (Ciba Corning 800, Medfield, MA, USA).

### Muscle biopsies

A muscle sample (150 mg) was obtained from the “*vastus lateralis*” using a Bergström needle. Half of the sample was included in Krebs’ buffer (pH 7.40) solution for immediate processing, and the remaining material was frozen in liquid nitrogen and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ .

The two molecular forms of glutathione, GSH and GSSG, were determined in the homogenate by high-performance liquid chromatography (HPLC) (12). *Lipid peroxidation* was assessed using cis-parinaric acid (CPA), a naturally fluorescent aliphatic acid containing four double bonds<sup>(13;14)</sup>.

*Gamma glutamyl cysteine synthase heavy subunit chain mRNA expression ( $\gamma\text{GCS-HS mRNA}$ )* was measured by RT-PCR method<sup>(15)</sup>. Values for  $\gamma\text{GCS-HS mRNA}$  were corrected by 18S mRNA and expressed as  $\gamma\text{GCS-HS}/18\text{S mRNA}$ .

Results are expressed as mean $\pm$ SEM. Training effects within groups were analyzed using Student paired-t test. Comparisons among groups were made using ANOVA analyses. Student Neuman Keuls test was used as a post-hoc test for contrast analysis. A p-value lower than 0.05 was taken as statistically significant.

## RESULTS

### Pre-training assessment

Anthropometric characteristics and lung function in the three groups: BMI<sub>N</sub>, BMI<sub>L</sub> and C are indicated in **Table 1**. On average, patients showed a severe obstructive ventilatory defect (FEV<sub>1</sub> % pred: BMI<sub>N</sub> 40.5  $\pm$  5.0%; BMI<sub>L</sub> 30.1 $\pm$ 3.8%; and, C: 102 $\pm$ 9.0%) and moderate arterial hypoxemia. Peak exercise tolerance (peak VO<sub>2</sub>/Kg) was severely reduced in COPD patients (BMI<sub>N</sub> 15.67  $\pm$  1.14; BMI<sub>L</sub> 14.82  $\pm$  2.2 ml.min<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup>) compared to controls (C: 23.7  $\pm$  0.85 ml.min<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup>).

No differences among the three groups were seen in pre-training glutathione levels (GSH:  $5.2 \pm 0.7$ ;  $5.36 \pm 0.7$ ; and  $4.6 \pm 1$  nmol/mg prot, BMI<sub>L</sub>, BMI<sub>N</sub> and C, respectively). Oxidized GSH (GSSG) levels and lipid peroxidation index, not reported, were also similar among groups. As described in <sup>(4)</sup>, eleven minutes of moderate intensity constant-work rate exercise did not generate statistically significant changes (post- minus pre-exercise) in: 1) total glutathione levels; and 2) lipid peroxidation index. Likewise, no differences in these variables were seen from rest to moderate exercise after training.

### Effects of physical training

Physiologic training effects at peak exercise (and  $\Delta V\dot{O}_{2peak}$ ) were observed in all three groups ( $p < 0.05$ ). Post-training  $\Delta V\dot{O}_{2peak}$  were:  $130 \pm 10$  ml.min<sup>-1</sup> (10%),  $p < 0.05$ , in BMI<sub>N</sub>;  $120 \pm 10$  ml.min<sup>-1</sup> (13%),  $p < 0.05$ , in BMI<sub>L</sub>; and,  $260 \pm 70$  ml.min<sup>-1</sup> (15%),  $p < 0.05$ , in healthy sedentary subjects.

*Changes in muscle redox status.* After training, muscle GSH levels increased in healthy subjects (from  $4.6 \pm 1$  to  $8.70 \pm 0.4$  nmol/mg,  $p < 0.01$ ). In contrast, GSH decreased in BMI<sub>L</sub> (from  $5.2 \pm 0.7$  to  $3.7 \pm 0.8$  nmol/mg prot,  $p < 0.05$ ); whereas no differences were seen in the BMI<sub>N</sub> (from  $5.36 \pm 0.7$  to  $6.7 \pm 0.9$  nmol/mg prot). Post-training changes in GSH ( $\Delta$ GSH) (**Figure 1**, left panel) were significantly different between BMI<sub>L</sub> ( $-1.5 \pm 0.7$  nmol/mg prot) and the other two groups ( $1.3 \pm 0.9$  and  $4.1 \pm 1$  nmol/mg prot, BMI<sub>N</sub> and C, respectively) ( $p < 0.05$  each). None of the three groups showed training-induced increase in lipid peroxidation (BMI<sub>L</sub>, from  $461 \pm 154$  to  $356 \pm 104$  AU; BMI<sub>N</sub>, from  $339 \pm 82$  to  $348 \pm 60$  AU; and, C, from  $358 \pm 75$  to  $439 \pm 72$  AU).

In the BMI<sub>L</sub> group, post-training GSH fall was accompanied by a strong tendency to increase in  $\gamma$ GCS-HS mRNA expression (**Figure 1**, right panel) in six out of the seven patients ( $p = 0.06$ ). In contrast, the post-training increase in GSH observed in healthy subjects was accompanied by a simultaneous tendency to fall in  $\gamma$ GCS-HS mRNA expression in four out the five subjects ( $p = 0.09$ ). No changes in  $\gamma$ GCS-HS mRNA expression were observed in BMI<sub>N</sub> ( $n = 8$ ). The contrast analysis among groups (ANOVA,  $p = 0.05$ ) showed statistical significant differences in  $\gamma$ GCS-HS mRNA regulation between each of the COPD groups (BMI<sub>L</sub> and BMI<sub>N</sub>) and healthy sedentary subjects.

## DISCUSSION

Abnormal regulation of skeletal muscle redox system leading to higher vulnerability to oxidative stress has been shown in COPD patients after training <sup>(4)</sup> and during high intensity exercise <sup>(5)</sup>. The impact of this phenomenon on cell function has not been established yet <sup>(16;17)</sup>. The analysis of the individual results in <sup>(4)</sup> prompted the hypothesis that the abnormal adaptation of the GSH system to training might be primarily associated to the COPD phenotype characterized by weight loss. Cell GSH seems to be an important regulator of myogenic differentiation in murine skeletal muscle C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cells <sup>(18)</sup>. Maintenance of optimal GSH levels might be a useful

**TABLE 1**  
CHARACTERISTICS OF THE STUDY GROUPS

	<b>COPD BMI<sub>N</sub></b>	<b>COPD BMI<sub>L</sub></b>	<b>Controls</b>
Age, yrs	67 ± 1.6	66 ± 2.1	62 ± 2.8
Weight, kg	80.2 ± 4.2	55.4 ± 2.3***	74.5 ± 1.3
BMI, kg/m <sup>2</sup>	28.2 ± 1.2	19.7 ± 1.6***	26.5 ± 0.9
FEV <sub>1</sub> , L	1.3 ± 0.2 <sup>‡</sup>	0.93 ± 0.1 <sup>†</sup>	3.3 ± 0.3
FEV <sub>1</sub> , % pred	41 ± 5.0 <sup>‡</sup>	30 ± 3.8 <sup>†</sup>	102 ± 9.0
FVC, % pred	68 ± 6.4 <sup>‡</sup>	56 ± 4.7 <sup>†</sup>	99 ± 7.4
TLC, % pred	105 ± 6.2	110 ± 7.8	93 ± 5.8
FRC, % pred	139 ± 11.9*	159 ± 17.3	91 ± 3.5
RV, % pred	164 ± 14.0 <sup>†</sup>	192 ± 28.0 <sup>†</sup>	82 ± 9.1
PaO <sub>2</sub> , mmHg	73 ± 3.3 <sup>‡</sup>	69 ± 4.2 <sup>‡</sup>	100 ± 3.7
PaCO <sub>2</sub> , mmHg	41 ± 2.4	42 ± 1.9	35 ± 1.5
VO <sub>2</sub> , peak, mL.min <sup>-1</sup>	1.25 ± 0.1 <sup>‡</sup>	0.82 ± 0.1***	1.76 ± 0.1

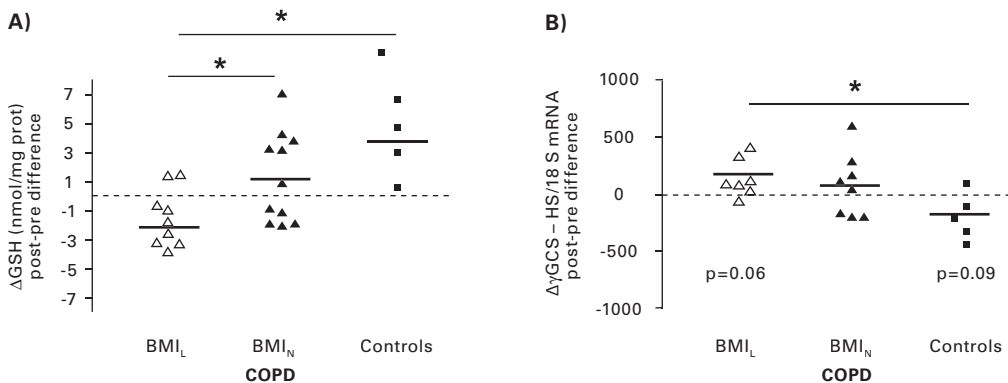
**Table 1.** Age in years; weight in Kg; body mass index (BMI) in Kg.m<sup>-2</sup>; forced expiratory volume during the first second (FEV<sub>1</sub>) in liters and percent of the predicted value; forced vital capacity (FVC, % pred.); total lung capacity (TLC, % pred.); functional residual capacity (FRC, % pred.); residual volume (RV, % pred.). Arterial oxygen (PaO<sub>2</sub>) and carbon dioxide (PaCO<sub>2</sub>) partial pressures measured breathing room air are expressed in mmHg. Comparisons against controls. \* p<0.05, <sup>†</sup> p<0.01 <sup>‡</sup>p<0.001. Comparisons between BMI<sub>N</sub> and BMI<sub>L</sub>. § p<0.05, <sup>||</sup> p<0.01, \*\* p<0.001.

strategy to prevent muscle damage in COPD. While adequate cytosol GSH guarantees a successful myogenic program, the maintenance of mitochondrial GSH levels may ensure cell survival as inferred from previous observations<sup>(19;20)</sup> in which the selective depletion of mitochondrial GSH sensitizes cells against chemical or cytokine-mediated cell death.

The main finding of the current study was that the BMI<sub>L</sub> group showed a distinctive behaviour in terms of muscle GSH response to training compared to BMI<sub>N</sub> and healthy sedentary subjects. As displayed in **Figure 1** left panel, ΔGSH clearly decreased in BMI<sub>L</sub> after training (in seven out of the nine patients). In contrast, GSH levels almost doubled in healthy sedentary subjects (post-training GSH increased in all five controls); whereas no changes in ΔGSH were observed in the BMI<sub>N</sub> patients, on average. It is of note, however, that in six out of the eleven BMI<sub>N</sub> patients physiological increase in GSH was observed, whereas GSH fell after training in the remaining five patients. The variability observed in BMI<sub>N</sub> may partly reflect the complex interactions that determine muscle dysfunction in COPD.

Muscle wasting is a serious complication in COPD, as well as in other chronic disorders<sup>(21)</sup>, and hence identification of responsible mechanisms may be of outmost relevance as muscle wasting stands as an independent predictor of mortality. Weight loss in COPD patients may likely reflect the end result of genetic susceptibility plus the interplay of several factors at pulmonary and peripheral level. Abnormal cytokine response, oxidative stress, tissue hypoxia, physical deconditioning and severity of the disease have been extensively reported<sup>(2)</sup> as potential triggers of peripheral muscle dysfunction in COPD. Redox dependent and redox independent pathways modulate key transcription factors such as NF- $\kappa$ B that has a prominent role in regulating myogenesis through control of cell cycle and muscle-specific transcription factors (i.e. Myo D)<sup>(22;23)</sup>. NF- $\kappa$ B is also known to regulate cell survival<sup>(24-26)</sup>. The analysis of these complexities is, however, clearly beyond the scope of this study.

Increased  $\gamma$ GCS-HS mRNA expression after training in BMI<sub>L</sub> (Figure 1, right panel) was interpreted as an adaptive mechanism to counteract exercise-induced oxidative stress in these patients.  $\gamma$ -GCS-HS is known to be up-regulated in response to divergent stressful conditions including oxidative stress or GSH depletion<sup>(15;27;28)</sup>.  $\gamma$ GCS-HS mRNA levels showed a trend to decrease in controls that was analyzed as a negative feed-back regulation due to the increase in



**FIGURE 1. Left panel:** Individual (symbols) and mean (horizontal lines) changes in muscle reduced glutathione ( $\Delta$ GSH) expressed as post- and pre-training differences (**Panel A**). COPD patients with low BMI (BMI<sub>L</sub>,  $n=9$ , open triangles); COPD patients with normal BMI (BMI<sub>N</sub>,  $n=11$ , solid triangles), and healthy sedentary subjects (Controls,  $n=5$ , solid squares). As described in the text, post-training  $\Delta$ GSH showed a two-fold increase in controls; no changes in BMI<sub>N</sub>; and, a significant fall in BMI<sub>L</sub> (ANOVA,  $p < 0.005$ ).  $\Delta$ GSH in BMI<sub>L</sub> showed significant differences with both BMI<sub>N</sub> and controls ( $* p < 0.05$  each).

**Right panel:** Effects of training on  $\gamma$ GCS-HS/18S mRNA expression expressed as described for the panel A (**Panel B**). BMI<sub>L</sub> ( $n=7$ ); BMI<sub>N</sub> ( $n=8$ ); and, Controls ( $n=5$ ).  $\gamma$ GCS-HS/18S mRNA expression showed a trend to increase in BMI<sub>L</sub>, no changes were seen in BMI<sub>N</sub>, whereas  $\gamma$ GCS-HS mRNA down-regulation was observed in C. Statistically significant differences were seen between BMI<sub>L</sub> and healthy sedentary subjects ( $* ANOVA$  with contrast analysis,  $p < 0.05$ ).

GSH levels. The negative correlation between the  $\Delta$ GSH and the fall in  $\gamma$ GCS-HS mRNA levels ( $r = -0.95$ ) after training supports the interpretation.

In summary, the current results indicate the association between muscle wasting and abnormal response of the redox system in COPD. The impact of muscle wasting on the prognosis of the disease prompts the need for further progress in the understanding of the mechanisms involved in weight loss. In this line, a proper characterization of the underlying genomic determinants of the abnormal response of the GSH system may facilitate the identification of pivotal factors modulating the progress of the disease. Moreover, it may also help to guide the debate on the rationale for interventions increasing the redox potential of muscle cells in the subset of COPD patients with low BMI. Whether or not new pharmacological antioxidant agents now under development might be useful to enhance physiological adaptations to endurance training remains speculative.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Felip Burgos, Conxi Gistau and Jose Luis Valera and all the technical staff of the Lung Function Laboratory for their skillful support during the study. Anna Capitán, Cristina Gonzalez and Eduard Vilar from EUIF Blanquerna are acknowledged for their outstanding work supervising the training sessions. We thank Carme Hernandez, coordinator nurse of the Home Care Unit, for her support in the logistics of the study. Finally, the authors acknowledge the material support received from Erich Jaeger to conduct the study.

## References

- (1) American Thoracic Society, European Respiratory Society. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: s1-s40.
- (2) Agusti AG, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 21(2):347-360.
- (3) Engelen MPKJ, Schols AMWJ, Does JD, Wouters EFM. Skeletal muscle weakness is associated with wasting of extremity fat-free mass but not with airflow obstruction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr* 2000; 71:733-738.
- (4) Rabinovich RA, Ardite E, Troosters T, Carbó N, Alonso J, Gonzalez de Suso JM et al. Reduced muscle redox capacity after endurance training in COPD patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1114-1118.
- (5) Couillard A, Maltais F, Saey D, Debigare R, Michaud A, Koechlin C et al. Exercise-induced quadriceps oxidative stress and peripheral muscle dysfunction in COPD patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167(12):1664-1669.
- (6) Engelen MPKJ, Schols AMWJ, Does JD, Deutz NEP, Wouters EF. Altered glutamate metabolism is associated with reduced muscle glutathione levels in patients with emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:98-103.
- (7) Chandel NS, Trzyna WX, McClintock DS, Schumacker PT. Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol* 2000; 165(2):1013-1021.
- (8) Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease

- (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(5):1256-1276.
- (9) A.T.S. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152 (Suppl.):S78-S121.
- (10) Roca J, Burgos F, Sunyer J, Saez M, Chinn S, Antó JM et al. Reference values for forced spirometry. *Eur Respir J* 1998; 11:1354-1362.
- (11) Roca J, Burgos F, Barberà JA, Sunyer J, Rodríguez-Roisin R, Castellsague J et al. Prediction equations for plethysmographic lung volumes. *Respir Med* 1998; 92:454-460.
- (12) Fariss MW, Reed DJ. High-performance liquid chromatography of thiols and disulfides: dinitrophenol derivatives. *Methods Enzymol* 1987; 143:101-109.
- (13) Hedley D, Chow S. Flow cytometric measurement of lipid peroxidation in vital cells using parinaric acid. *Cytometry* 1992; 13:686-692.
- (14) Steenbergen RH, Drummen GP, Op den Kamp JA, Post JA. The use of cis-parinaric acid to measure lipid peroxidation in cardiomyocytes during ischemia and reperfusion. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1330(2):127-137.
- (15) Ardite E, Sans M, Panes J, Romero FJ, Pique JM, Fernandez Checa JC. Replenishment of glutathione levels improves mucosal function in experimental acute colitis. *Lab Invest* 2000; 80(5):734-744.
- (16) Meister A, Anderson M. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983; 52:711-760.
- (17) Fernandez Checa JC, Ookthens M. Regulation of hepatic GSH. In: Tavoloni N, Berk P, editors. *Hepatic anion transport and bile secretion physiology and pathophysiology*. 1993: 345-395.
- (18) Ardite E, Rabinovich R, Barbera JA, Roca J, Fernandez-Checa JC. Critical Levels of Glutathione Are Needed for Differentiation in Skeletal Muscle Cells C2C12. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 167[7], A129. 2003.
- (19) Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Calvo M, Enrich C et al. Defective TNF-alpha-mediated hepatocellular apoptosis and liver damage in acidic sphingomyelinase knockout mice. *J Clin Invest* 2003; 111(2):197-208.
- (20) Ortega AL, Carretero J, Obrador E, Gambini J, Asensi M, Rodilla V et al. Tumor cytotoxicity by endothelial cells. Impairment of the mitochondrial system for glutathione uptake in mouse B16 melanoma cells that survive after in vitro interaction with the hepatic sinusoidal endothelium. *J Biol Chem* 2003; 278(16):13888-13897.
- (21) Franssen FM, Wouters EF, Schols AM. The contribution of starvation, deconditioning and ageing to the observed alterations in peripheral skeletal muscle in chronic organ diseases. *Clin Nutr* 2002; 21(1):1-14.
- (22) Langen RC, Schols AM, Kelders MC, Van Der Velden JL, Wouters EF, Janssen-Heininger YM. Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenesis through redox-dependent and -independent pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283(3):C714-C721.
- (23) Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS, Jr. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 1999; 19(8):5785-5799.
- (24) Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS, Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998; 281(5383):1680-1683.
- (25) Colell A, Garcia-Ruiz C, Roman J, Ballesta A, Fernandez-Checa JC. Ganglioside GD3 enhances apoptosis by suppressing the nuclear factor-kappa B-dependent survival pathway. *FASEB J* 2001; 15(6):1068-1070.
- (26) Reid MB, Li YP. Tumor necrosis factor-alpha and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir Res* 2001; 2(5):269-272.
- (27) Meister A, Yan N, Meister. Amino acid sequence of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem* 1990; 265(3):1588-1593.
- (28) Morales A, Miranda M, Sanchez-Reyes A, Colell A, Biete A, Fernandez Checa JC. Transcriptional regulation of the heavy subunit chain of gamma-glutamylcysteine synthetase by ionizing radiation. *FEBS Lett* 1998; 427(1):15-20.



## MANUSCRITO III

## Increased tumour necrosis factor- $\alpha$ plasma levels during moderate-intensity exercise in COPD patients

Roberto A Rabinovich <sup>(1)</sup>, Maite Figueras<sup>(2)</sup>, Esther Ardite <sup>(1)</sup>, Neus Carbó<sup>(2)</sup>, Thierry Troosters <sup>(3)</sup>, Xavier Filella<sup>(4)</sup>, Joan Albert Barberà <sup>(1)</sup>, José C. Fernandez- Checa <sup>(5)</sup>, Josep M. Argilés <sup>(2)</sup>, and, Josep Roca<sup>(1)</sup>

**ABSTRACT:** Post-training down-regulation of muscle tumour necrosis factor (TNF $\alpha$ ) messenger ribonucleic acid (mRNA) expression and decrease in cellular TNF $\alpha$  levels have been reported in the elderly. It is hypothesized that chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients may not show these adaptations due to their reduced ability to increase muscle antioxidant capacity with training. Eleven COPD patients (FEV<sub>1</sub> 36 $\pm$ 4 % pred) and six age matched controls were studied. Pre- and post-training plasma levels of: TNF $\alpha$ , soluble TNF receptors (sTNF-R, sTNF-R55 and sTNF-R75) and interleukin (IL-6) in plasma at rest and during exercise and *vastus lateralis* TNF $\alpha$ -mRNA were examined. Moderate-intensity constant-work rate exercise (eleven minutes of 40% pre-training Wpeak) increased pre-training plasma TNF $\alpha$  levels in COPD patients (from 17 $\pm$ 3.2 to 23 $\pm$ 2.7 pg/ml;  $p < 0.005$ ) but not in controls (from 18.7 $\pm$ 4.6 to 19 $\pm$ 3.2 pg/ml). No changes were observed in sTNF-R or in IL-6 levels. After eight-weeks endurance training, moderate-intensity exercise increased plasma TNF $\alpha$  levels similarly to pre-training (from 16 $\pm$ 3 to 21 $\pm$ 4 pg/ml;  $p < 0.01$ ). Pre-training muscle TNF $\alpha$ -mRNA expression was significantly higher in COPD patients than in controls (29.3 $\pm$ 13.9 vs 5.0 $\pm$ 1.5 TNF $\alpha$ /18S, respectively;  $p < 0.05$ ), but no changes were observed after exercise or training. It is concluded that moderate-intensity exercise abnormally increases plasma TNF $\alpha$  levels in chronic obstructive pulmonary disease patients without exercise-induced upregulation of the TNF $\alpha$  gene in skeletal muscle.

*Eur Respir J* 2003; 21: 789-794.

(1) Servei de Pneumologia (ICPCT) <sup>(1)</sup> Hospital Clínic, Facultat de Medicina, IDIBAPS; Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia <sup>(2)</sup>, Universitat de Barcelona, Barcelona; Faculty of Physical Education and Physiotherapy, K.U.L., Leuven, Belgium <sup>(3)</sup>; Servicio de Bioquímica Clínica (Unitat d'Estudi del Càncer) <sup>(4)</sup> and Liver Unit (IMD) and CSIC <sup>(5)</sup>, Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona.

(2) Supported by Grants FIS 99/0029 and 00/0281 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias; E-Remedy (IST-2000-25146) from the European Union (DG XIII); and, Comissionat per a Universitats i Recerca de la Generalitat de Catalunya (1999 SGR 00228).

(3) Roberto A. Rabinovich and Thierry Troosters were research fellows supported by the European Respiratory Society, 2000.

(4) Maite Figueras is recipient of a pre-doctoral scholarship from the Ministerio de Educación y Cultura of the Spanish Government.

(5) Correspondence: Josep Roca, MD. Servei de Pneumologia. Hospital Clínic. Villarroel 170. Barcelona 08036. Spain. Phone 34-93-227-5540; FAX 34-93-227-5455; E-mail: jroca@clinic.ub.es

**Running head:** TNF $\alpha$  during exercise in COPD

**Word count:** Abstract: 200

**Body text:** 2649

## Introduction

Different lines of evidence involve cytokines, particularly tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), in the process of skeletal muscle wasting observed in approximately 20% of COPD patients (1-5). Muscle redox status itself and activation of transcription factors such as NF $\kappa$ -B by reactive oxygen species (6;7) seem to be involved in the signal-transduction pathways that modulate cellular TNF $\alpha$  levels. Moreover, it has been reported that exercise training in normal elderly humans down-regulates TNF $\alpha$ -mRNA expression and decreases muscle TNF $\alpha$  levels (8) likely related to enhancement of the O<sub>2</sub> transport/O<sub>2</sub> utilization system.

It is well accepted that heavy exercise induces abnormally high levels of oxidative stress in COPD patients (9). We recently showed (10) that after eight weeks of endurance training at the same relative load, muscle redox potential appear to be reduced in COPD patients, but not in age-matched healthy sedentary controls.

In the present study, we hypothesize that COPD patients may present an abnormal cytokine response to exercise. They might not show training down-regulation of muscle TNF $\alpha$ , as reported in healthy subjects (8), because of the lower antioxidant capacity (10) after training. The study examines the effects of both endurance training and moderate intensity exercise (pre- and post-training) on: 1) cytokine plasma levels (TNF $\alpha$ ; soluble TNF receptors: sTNF-R; sTNF-R55, sTNF-R75; and, IL-6); and, 2) mRNA expression for TNF $\alpha$  in limb skeletal muscle, in a population of eleven patients with COPD and six age matched healthy controls (10).

## Methods

### *Study Group*

Eleven of the seventeen COPD patients according to the ATS criteria (11) examined in (10) and six healthy sedentary age and gender-matched controls were included in the study. All participants signed the written informed consent approved by the Committee on Investigations involving Human Subjects at the Hospital Clínic, Universitat de Barcelona.

### *Study design*

Selection procedures for inclusion in the study and details of the design have been reported in (10). Briefly, we carried out pre- and post-training measurements to assess the effects of endurance training (incremental exercise testing; 31-phosphorus magnetic resonance spectroscopy; and, V'O<sub>2</sub>-on kinetics, not reported in the present study) and to evaluate changes in cytokine plasma levels during constant-work rate exercise.

All subjects trained 5 d per week for 8 wk. Training sessions were of 60 min duration and split into small blocks of 2 to 5 min of high intensity continuous cycling (around 60 cycles per minute) (at approximately 90% of the W<sub>peak</sub> at the end of the training program) for at least an effective period of 30 min. Recovery time between the high intensity periods consisted in cycling at the same speed and under 60 % of pre-training W<sub>peak</sub>. The first week was used as an adaptation period where the high intensity blocks were initially of 60 % of W<sub>peak</sub>. After that the work level has been raised until reach values close to the 90 % pre-training W<sub>peak</sub> and maintained until the end of the training period.

### *Constant work rate exercise*

After placing an arterial catheter (Seldicath, Plastimed, Saint-Leu-La-Forêt, France), subjects were installed on the cycle ergometer with the mouth piece in place which allowed on-line calculation of pulmonary O<sub>2</sub> uptake (V'O<sub>2</sub>). They cycled for eleven minutes at a constant work rate of 40% pre-training W<sub>peak</sub> at a speed of 60 r.p.m. The rationale for choosing a moderate intensity constant-work rate protocol was to achieve a sustainable exercise activity (12). Arterial blood sampling for measurements of cytokine plasma levels was done at rest, at 11 min of steady state exercise and at 20 min post-exercise.

### *Muscle Biopsies*

After appropriate antiseptics and anesthetics of the skin, a muscle biopsy was obtained in a subset of nine COPD patients and the six healthy controls from the "vastus lateralis" using a Bergström needle. Muscle samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C for their later analysis.

### Cytokine measurements

Plasma levels of TNF $\alpha$ , soluble TNF-receptors (*sTNF-R*; *sTNF-R55*, *sTNF-R75*) and IL-6 were assessed by ELISA (Medgenix, BioSource Europe, Fleurus, Belgium, for IL-6 and TNF- $\alpha$ ; Bender MedSystems, Vienna, Austria for *sTNF-R*) (13); results were expressed in pg/ml. Intra-assay coefficients of variation (CV) at different TNF $\alpha$  concentrations (86.7 $\pm$ 4.4 pg/ml, 591 $\pm$ 22 pg/ml, and 1027 $\pm$ 15 pg/ml; n=20) were 5.1 %, 3.7 % and 1.4 %, respectively. Inter-assay CV at different TNF $\alpha$  concentrations (41 $\pm$ 4 pg/ml, 162 $\pm$ 13 pg/ml and 664 $\pm$ 66 pg/ml; n=10, 13 and 10 respectively) were 9.7 %, 8.0 %, and 9.9 % respectively. The minimum detectable concentration is estimated to be 3 pg/ml (Medgenix, Fleurus, Belgium).

Skeletal muscle mRNA expression for TNF $\alpha$ : Total RNA from vastus lateralis muscle was extracted by TriPure™ kit (Boehringer-Mannheim, Germany), a commercial modification of the acid guanidinium isothiocyanate/phenol/chloroform method described by Chomczynski and Sacchi (14). TNF $\alpha$  mRNA was measured by a two-step RT-PCR method (15) using appropriate forward (5'- AAG AGT TCC CCA GGG ACC TCT -3') and reverse (5'- CCT GGG AGT AGA TGA GGT ACA- 3') primers (Gene specific relative RT-PCR kit 5345). The predicted size of the amplified product using these primers is 233 bp. Briefly, for each sample, 5  $\mu$ g of RNA were reverse-transcribed (RT) into cDNA in the presence of appropriate anti-sense primers. The PCR reaction was carried out as follows: 1x (94°C, 1:00 min); 33x (94°C, 1:00 min; 61°C, 1:00 min; 72°C, 2:00 min); 1x (72°C, 4 min) in the presence of 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>. All the RT-PCR were standardized at 33 cycles to ensure that the samples were assayed within the exponential phase of the PCR reaction. The RT-PCR products were electrophoresed in 2% agarose gels in TBE buffer. The gel was stained with ethidium bromide and quantitated by scanning densitometry. Values for TNF $\alpha$ -mRNA were corrected by 18S RNA expression and expressed as % TNF $\alpha$ /18S ratio. The set of primers used amplify a segment of the 18S rRNA with a predicted size of 495 bp. The abundance of rRNA is a major limitation to its utility as a control, since an endogenous control must be in the same linear ranges as the RNA under study when amplified under the same conditions.

Ambion's Competimer™ technology (patent pending) allow to attenuate the amplification of 18S-rRNA by using a modified primer (competimer) that cannot be extended. In this way the expression of the internal control can be modulated to the level of even rare messages, without affecting the performance of other targets in a multiplex PCR reaction. The proportion of primer/competimer used was 3:17.

### Data analysis

Results are expressed as mean $\pm$ SEM. Changes within groups were analyzed using Student paired-t test. Comparisons between groups were done using Student unpaired-t test. When normality test fail, a logarithmic transformation was applied to the data. A p-value < 0.05 was taken as statistically significant.

### Results

The COPD group (age 65 $\pm$ 1.4 yrs, range 59 to 72 yrs; and, BMI 25 $\pm$ 1.5 kg/m<sup>2</sup>, range 15 to 36 kg/m<sup>2</sup>) (**Table I**) encompassed a large spectrum of severity of the disease. These patients showed a severe obstructive ventilatory defect (FEV<sub>1</sub> 40 $\pm$ 4.4 % pred, range 15 to 57% pred; PaO<sub>2</sub> 69 $\pm$ 3.3 mmHg, range 54 to 89 mmHg) with limited exercise tolerance (V'O<sub>2</sub> peak 17 $\pm$ 1.6 ml/Kg/min, range 9 to 27 mL/Kg/min). Healthy sedentary controls were matched by gender (all men), age (age 63 $\pm$ 1.9 yrs) and body mass index (BMI, 26.9 $\pm$ 0.9 kg/m<sup>2</sup>) and showed normal pulmonary function test values (FEV<sub>1</sub> 112 $\pm$ 11 % pred) and exercise tolerance (V'O<sub>2</sub> peak 24 $\pm$ 0.8 ml/Kg/min). As reported in detail in (10), a significant training effect was observed in the two groups. In COPD patients, exercise tolerance increased ( $\Delta$ Wpeak 41 $\pm$ 12% and  $\Delta$ V'O<sub>2</sub> peak 10.5 $\pm$ 3%, p < 0.01 each) and arterial [La] at iso-work rate fell -20 $\pm$ 6 % after training (p < 0.01). Likewise, healthy sedentary controls enhanced exercise tolerance ( $\Delta$ Wpeak 32 $\pm$ 13%, p = 0.05; and,  $\Delta$ V'O<sub>2</sub> peak 14 $\pm$ 3% p < 0.005) and arterial [La] at iso-work rate fell -12.5  $\pm$  3.9 % after training (p < 0.05).

### Cytokine plasma levels during exercise and after training

No differences in TNF $\alpha$  plasma levels at rest were observed between patients and controls

**Table 1.** Characteristics of the study group

	<b>COPD</b>	<b>Control</b>
Age, yrs	<b>65 ± 1.4</b>	<b>63 ± 1.9</b>
Weight, kg	<b>66.0 ± 4.1</b>	<b>75.7 ± 1.6*</b>
BMI, kg m <sup>-2</sup>	<b>24.7 ± 1.5</b>	<b>26.9 ± 0.9</b>
FEV <sub>1</sub> , L	<b>1.13 ± 0.1</b>	<b>3.5 ± 0.3***</b>
FEV <sub>1</sub> , % pred	<b>40 ± 4.4</b>	<b>112 ± 10.6***</b>
FVC, % pred	<b>59 ± 3.5</b>	<b>108 ± 6.5***</b>
FEV <sub>1</sub> /FVC, %	<b>0.45 ± 0.03</b>	<b>0.80 ± 0.06***</b>
TLC, % pred	<b>94 ± 4.6</b>	<b>99 ± 7.0</b>
FRC, % pred	<b>126 ± 10.9</b>	<b>96 ± 5.3**</b>
RV/TLC, %	<b>0.6 ± 0.03</b>	<b>0.32 ± 0.03***</b>
PaO <sub>2</sub> , mmHg	<b>69 ± 3.3</b>	<b>100 ± 3.3***</b>
PaCO <sub>2</sub> , mmHg	<b>42 ± 1.6</b>	<b>36 ± 1.3***</b>

**Table 1.** Data are presented as mean±SEM. COPD: chronic obstructive pulmonary disease; BMI: body mass index; FEV<sub>1</sub>: forced expiratory volume in one second; % pred: percentage of the predicted value; FVC: forced vital capacity; TLC: total lung capacity; FRC: functional residual capacity; RV: residual volume; PaO<sub>2</sub> and PaCO<sub>2</sub>: arterial oxygen and carbon dioxide tension, respectively, both measured breathing room air. \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001 (unpaired-t test); (1 mmHg=0.133 kPa.).

(17±3.2 pg/ml and 18.7±4.6 pg/ml; respectively). It is of note, however, that COPD patients significantly increased TNFα plasma levels during moderate intensity constant-work rate exercise (from 17±3.2 pg/ml to 23±2.7 pg/ml, p<0.005), not seen in the control group. It should be noted that all the subjects reach a plateau in the oxygen uptake at this work load. TNFα plasma levels showed a trend to returned to resting values 20 min after exercise (**Figure 1**, left panels top and bottom, respectively). Exercise training did not modify the exercise-induced response to TNFα plasma levels seen in the COPD group (**Figure 1**, right panels).

Pre-training plasma levels of TNF soluble receptors (sTNF-R) at rest were similar between COPD patients (0.19±0.04 pg/ml and 0.69±0.12

pg/ml, sTNF-R55 and sTNF-R75, respectively) and controls (0.40±0.1 pg/ml and 0.90±0.28 pg/ml, respectively). Likewise, no differences between the two groups were seen in IL-6 plasma levels at rest (7.9±2.4 pg/ml and 6.1±3.8 pg/ml, COPD and controls respectively). No changes in sTNF-R nor in IL-6 were observed during moderate intensity exercise nor after training in the two groups (data not shown).

#### *Skeletal muscle TNFα-mRNA expression*

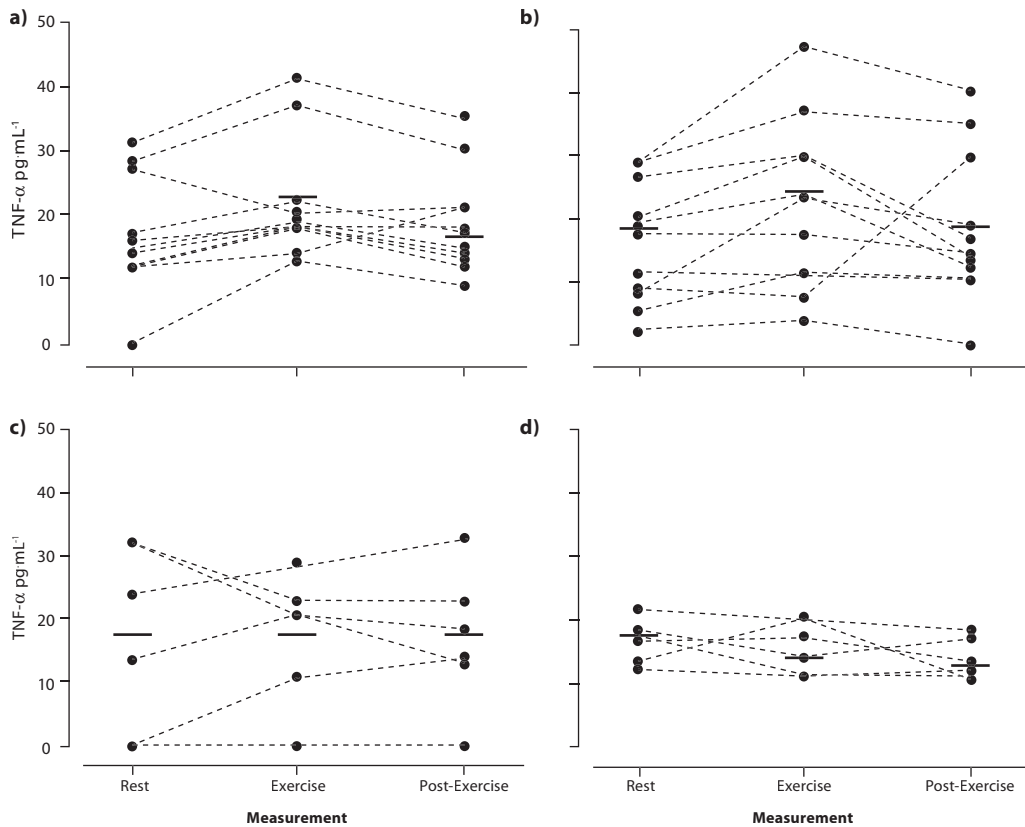
At rest, TNFα-mRNA expression was significantly higher in COPD patients (29.3 ± 13.9 TNFα/18S) than in healthy sedentary subjects (5.0 ± 1.5 TNFα/18S) (p< 0.05) showing a marked heteroscedascity in the COPD group, as displayed in **Figure 2**. No changes in muscle TNFα-mRNA expression after moderate intensity exercise (post-minus pre-exercise diff. -8.3±14.7 TNFα/18S), nor after endurance training (post- minus pre-training diff. 5.4±8.3 TNFα/18S), were seen in COPD patients. Similarly, healthy sedentary controls did not show changes in muscle TNFα-mRNA expression after exercise (by 8.95±9.2 TNFα/18S), nor after training (by 3±15.8 TNFα/18S).

Taking into account only those patients who underwent muscle biopsy, no correlation was found between muscle TNFα-mRNA expression and plasma TNFα levels. It is of note that no differences were observed between these subgroup compared to the whole group in plasma TNFα levels (19 ±1.7 pg/ml and 17±3.2 pg/ml, respectively).

## **Discussion**

### *Increase in TNFα plasma levels*

The main finding of the present study was a consistent rise in TNFα plasma levels (pre- and post-training) after eleven minutes of moderate intensity constant-work rate cycling exercise in COPD patients (**Figure 1**, top panels), not observed in healthy sedentary controls (**Figure 1**, bottom panels). This phenomenon was not accompanied by changes in TNF soluble receptors (sTNF-R) nor in IL-6. To our knowledge, this study reports for the first time higher sensitivity of COPD patients



**Figure 1.** Individual plasma tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$  levels before (a and c) and after (b and d) training in chronic obstructive pulmonary disease patients (a and b) ( $p < 0.005$  and  $p < 0.01$ , exercise *versus* rest, respectively) and control subjects (c and d) (both  $p =$  non significant). Levels of TNF- $\alpha$  were measured at rest, after 11 min of moderate-intensity constant-work-rate exercise at 40% of pretraining peak work-rate, and 20 min after exercise. Horizontal bars represent means.

to increase in cytokine plasma levels at moderate intensity sustainable exercise. Interestingly, normal subjects and trained athletes at high exercise levels show increase plasma IL-6 levels as the predominant exercise-induced cytokine.

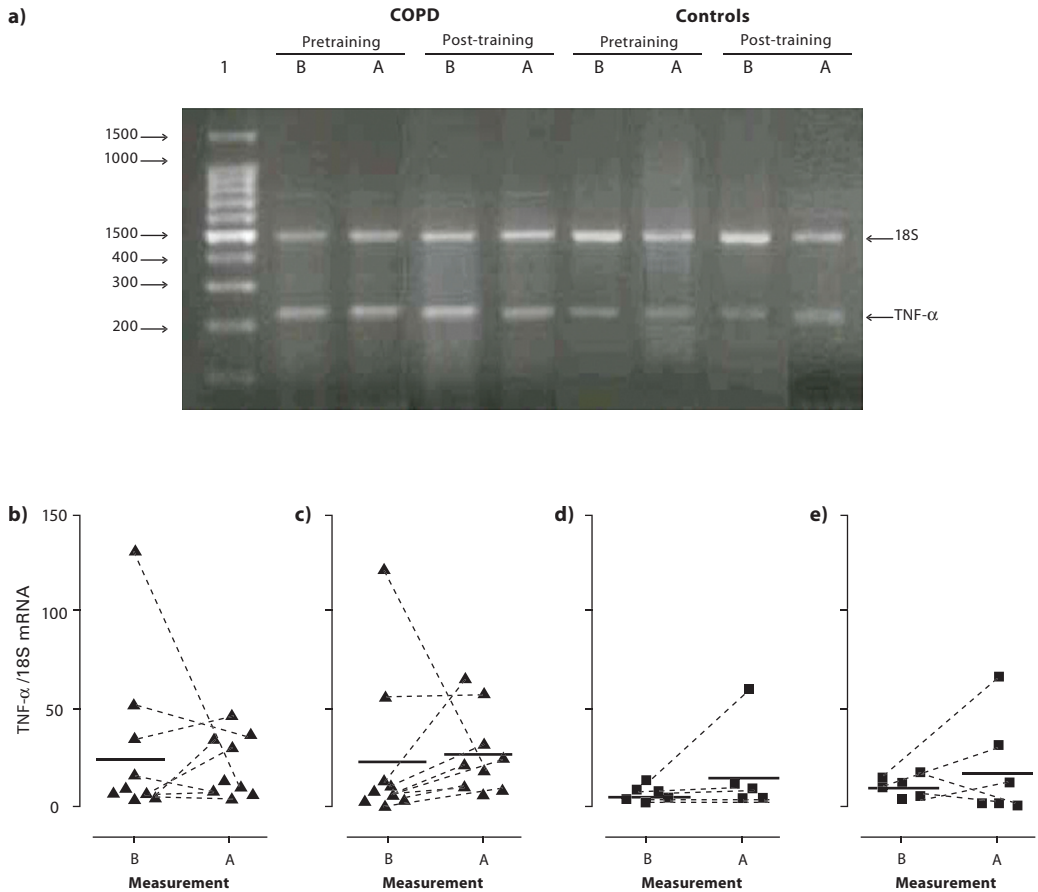
Baseline plasma TNF $\alpha$  (and sTNF-R) was on average within the reference limits of our laboratory ( $< 20$  pg/ml) (16). Since the COPD group showed normal BMI on average, no differences between patients and controls were expected at rest

( $17.2 \pm 3.2$  vs  $18.7 \pm 4.6$  pg/ml, patients and controls, respectively). Unfortunately body composition has not been assessed in the present study and analysis by fat free mass could not be done (17).

It should be noted that, even after eight weeks of exercise training, moderate exercise has shown increasing levels of plasma TNF $\alpha$  not seen in the control group. In healthy subjects (18), it is well established that both strenuous and long-term endurance exercise increase circulating

pro-inflammatory cytokines, in particular IL-6. Although the sources of cytokine release during strenuous exercise remain controversial, different potential origins for increased secretion of these mediators have been suggested: 1) most likely release from intensively working muscles (19); 2) sympathetic activation acting on immune organs (18); 3) Fat tissue (20); and, 4) Blood mononuclear

cells (21;22). The later is, however, a controversial issue (23;24). Increased IL6-mRNA expression was detected in lower limb muscle biopsies after marathon running, coinciding with the rise of circulating IL-6 levels (19). Cytokine plasma levels seem to be related to two main factors: 1) intensity and duration of exercise; and, 2) muscle damage induced by high-intensity exercise.



**Figure 2.** a) Representative reverse transcriptase polymerase chain reaction for tumour necrosis factor (TNF)-α messenger ribonucleic acid (mRNA) (233 base pairs (bp)) and 18S mRNA (488 bp) ribosomal subunit expression in vastus lateralis muscle (lane 1: ribonucleic acid ladder). b) Individual TNF-α/18S mRNA expression in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients (b and c) and healthy controls (d and e) before (b and d) and after (c and e) training, before (B) and after (A) constant-work-rate exercise at 40% of pretraining peak work-rate. Horizontal bars represent means.  $p < 0.05$  versus healthy controls.



The level of exercise performed by our study group was moderate and perfectly sustainable as assessed by steady state conditions in heart rate and oxygen uptake. Accordingly, none of the former circumstances linked to strenuous exercise were present in our study.

It is well accepted that skeletal muscle TNF $\alpha$  may have autocrine and/or paracrine physiological functions, and its role in metabolic regulation is well known. It has been described that TNF $\alpha$  may decrease fat mass by stimulating lipolysis (25) and increasing leptin plasma levels (26). Signal-transduction pathways sensitive to reactive oxygen species (7;27) seem to play a fundamental role modulating cellular levels of this cytokine (8). In these patients, however, moderate levels of exercise did not provoke detectable changes in muscle redox status, as reported in detail in (10). Likewise, no exercise-induced change in TNF $\alpha$ -mRNA expression was seen in the COPD group. In this study, TNF $\alpha$ -mRNA expression has been analyzed by RT-PCR. A single product of the expected size was amplified. Although not sequenced, this corresponds, with all likelihood, to the predicted segment of TNF $\alpha$ , based upon its electrophoretic mobility.

Since the second muscle biopsy was taken immediately after exercise, the time elapsed for de novo synthesis of muscle TNF $\alpha$  seems to be insufficient (28). Similarly, Colbert and coworkers have found plasma IL-6 to be increased in mice after intense exercise without any change in mRNA expression in lung, liver, brain, nor in skeletal muscle (29). In concert with our findings, these authors did not find increasing muscle TNF $\alpha$ -mRNA expression after exercise. Nevertheless we can speculate that exercise could have triggered the release of pre-formed TNF from the muscle involving post-transcriptional regulation mechanisms. Enhanced levels of ROS (10) may induce cytokine release at a post-transcriptional level, independent of RNA synthesis (30). Although we characterized the regulation of TNF $\alpha$  at the molecular level by determining the *vastus lateralis* TNF $\alpha$ -mRNA expression, the lack of measurement of its cellular protein levels, due to the limited availability of muscle sample, limits the interpretation of some of the findings.

#### *Lack of training effects on muscle TNF $\alpha$ mRNA expression*

Up-regulation of muscle TNF $\alpha$ -mRNA expression (**Figure 2**) was observed in three out of nine (30%) COPD in the pre-training measurements at rest (BMI, 20.6, 20.1 and 26.1 kg.m<sup>-2</sup>, respectively). These three patients did not present abnormal resting plasma TNF $\alpha$  nor differences in exercise or training effects compared to the rest of the subjects. In the present study, no relationships were found between TNF $\alpha$  plasma levels and BMI nor between TNF $\alpha$  plasma levels and TNF $\alpha$ -mRNA expression.

The COPD group did not show training-induced down-regulation of TNF $\alpha$ -mRNA expression. We expected this kind of result because of the lower muscle antioxidant capability after high-intensity physical training in these patients compared to healthy controls (10). It is well known that ROS induced a dose-dependent release of cytokines (31). Moreover, the administration of antioxidant have demonstrated to down regulate the release of cytokines secondarily to exercise (23). We acknowledge, however, that the lack of measurements of muscle TNF $\alpha$  levels do not allow clear-cut conclusions in this regard.

The concomitant absence of training-induced down-regulation of muscle TNF $\alpha$ -mRNA expression in the control group should also be mentioned, which could be partly attributable to the different type of training program employed in the current study compared to (8). It is of note that the aforementioned study was conducted in frail elderly subjects (81 $\pm$ 1 year) who underwent a three months light stretching exercise pre-training program followed by a supervised resistance exercise training program (3 days/wk) for an additional period of three months. In summary, both the duration of training and muscle groups exercised were different from our study.

We conclude that patients with COPD show an abnormal rise of circulating plasma TNF $\alpha$  during moderate intensity exercise, not accompanied by an increase in IL-6 levels usually seen in healthy subjects during strenuous exercise. Concomitant with an absence of training-induced effects on muscle TNF $\alpha$ -mRNA expression. We consider that

our results open striking questions, particularly those related with the abnormal TNF $\alpha$  response during moderate exercise and its relationships with systemic effects of the disease. Further research is needed to clarify the origin and physiological meaning of these findings.

**Acknowledgements.** The authors are grateful to Felip Burgos, Conxi Gistau and Jose Luis Valera and all the technical staff of the Lung Function Laboratory for their skillful support during the study. Jordi Vilaró, Anna Capitán, Cristina Gonzalez and Eduard Vilar from EUIF Blanquerna are acknowledged for their outstanding work conducting the training sessions. We acknowledge Carmen Hernandez, coordinator nurse of the Home Care Unit, for the help in the patient recruitment. We thank especially to Dr Ricardo Bastos for his valuable help in the revision of the manuscript. Dr. Peter Wagner is acknowledged for carefully and critical reading the manuscript. Finally, the authors are grateful for the support received from Erich Jaeger to conduct the study.

## References

1. Takabatake M, Nakamura H, Abe S, Hino T, Saito H, Yuki H, Kato S, Tomoike H. Circulating leptin in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:1215-1219.
2. Di Francia M, Barbier D, Mege J, Orehek J. Tumor necrosis factor-alpha and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:1453-1455.
3. de Godoy I, Donahoe M, Calhoun WJ, Mancino J, Rogers RM. Elevated TNF- $\alpha$  production by peripheral blood monocytes of weight-losing COPD patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:633-637.
4. Creutzberg EC, Schols AMWJ, Weling-Scheepers CAPM, Buurman WAW, Wouters EF. Characterization of nonresponse to high caloric oral nutritional therapy in depleted patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:745-752.
5. Takabatake M, Nakamura H, Abe H, Inoue S, Hino T, Saito H, Yuki H, Kato S, Tomoike H. The Relationship between Chronic Hypoxemia and Activation of the Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  System in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1179-1184.
6. Li YP, Schwartz RJ, Waddell IA, Holloway BR, Reid MB. Skeletal muscle myocytes undergo ptein loss and reactive oxygen-mediated NF-kB activation in response to TNF- $\alpha$ . *FASEB J* 1998; 12:871-880.
7. Chandel NS, Trzyna WX, McClintock DS, Schumacker PT. Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol* 2000; 165:1013-1021.
8. Greiwe JS, Cheng B, Rubin DC, Yarasheski KE, Semenkovich CF. Resistance exercise decreases skeletal muscle tumor necrosis factor  $\alpha$  in frail elderly humans. *FASEB J* 2001; 15:475-482.
9. Viña J, Servera E, Asensi M, Sastre J, Pallardó FV, Ferrero JA, Asunción JGdl, Antón V, Marín J. Exercise causes blood glutathione oxidation in chronic obstructive pulmonary disease: prevention of O<sub>2</sub> therapy. *J Appl Physiol* 1996; 81:2199-2202.
10. Rabinovich RA, Ardite E, Troosters T, Carbó N, Alonso J, Gonzalez de Suso JM, Vilaró J, Barberà JA, Figueras M, Argiles JM, Fernandez Checa JC, Roca J. Reduced muscle redox capacity after endurance training in COPD patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1114-1118.
11. A.T.S. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152 (Suppl.):S78-S121.
12. Sala E, Roca J, Marrades RM, Alonso J, Gonzalez de Suso JM, Moreno A, Barbera J, Nadal J, Jover Ll, Rodriguez-Roisin R, Wagner PD. Effects of endurance training on skeletal muscle bioenergetics in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:1726-1734.
13. Beutler B, Cerami A. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N Engl J Med* 1987; 316:379-385.
14. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-159.
15. Ardite E, Sans M, Panes J, Romero FJ, Pique JM, Fernandez Checa JC. Replenishment of glutathione levels improves mucosal function in experimental acute colitis. *Lab Invest* 2000; 80:734-744.



16. Kreuzer KA, Rockstroh JK, Sauerbruch T, Spengler U. A comparative study of different enzyme immunosorbent assays for human tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol Methods* 1996; 195:49-54.
17. Eid AA, Ionescu AA, Nixon LS, Lewis-Jenkins V, Matthews SB, Griffiths TL, Shale DJ. Inflammatory response and body composition in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1414-1418.
18. Drenth JP, Van Uum SH, Van Deuren M, Pesman GJ, Van d, V, Van der Meer JW. Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but downregulates ex vivo TNF-alpha and IL-1 beta production. *J Appl Physiol* 1995; 79:1497-1503.
19. Ostrowski K, Schjerling P, Pedersen BK. Physical activity and plasma interleukin-6 in humans--effect of intensity of exercise. *Eur J Appl Physiol* 2000; 83:512-515.
20. Nara M, Kanda T, Tsukui S, Inukai T, Shimomura Y, Inoue S, Kobayashi I. Running exercise increases tumor necrosis factor-alpha secreting from mesenteric fat in insulin-resistant rats. *Life Sci* 1999; 65:237-244.
21. Rhind SG, Castellani JW, Brenner IK, Shephard RJ, Zamecnik J, Montain SJ, Young AJ, Shek PN. Intracellular monocyte and serum cytokine expression is modulated by exhausting exercise and cold exposure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 281:R66-R75.
22. Rivier A, Pene J, Chanez P, Anselme F, Caillaud C, Prefaut C, Godard P, Bousquet J. Release of cytokines by blood monocytes during strenuous exercise. *Int J Sports Med* 1994; 15:192-198.
23. Vassilakopoulos T, Katsaounou P, Karatza MH, Kollintza A, Zakyntinos S, Roussos C. Strenuous resistive breathing induces plasma cytokines: role of antioxidants and monocytes. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:1572-1578.
24. Moldoveanu AI, Shephard RJ, Shek PN. Exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha in blood mononuclear cells. *J Appl Physiol* 2000; 89:1499-1504.
25. Hauner H, Petruschke T, Russ M, Rohrig K, Eckel J. Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture. *Diabetologia* 1995; 38:764-771.
26. Grunfeld C, Zhao C, Fuller J, Pollack A, Moser A, Friedman J, Feingold KR. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. *J Clin Invest* 1996; 97:2152-2157.
27. Vassilakopoulos T, Zakyntinos S, Roussos C. Strenuous resistive breathing induces proinflammatory cytokines and stimulates the HPA axis in humans. *Am J Physiol* 1999; 277:R1013-R1019.
28. Albarenque SM, Suzuki K, Nakayama H, Doi K. Kinetics of cytokines mRnas expression in the dorsal skin of WBN/ILA-Ht rats following topical application of T-2 toxin. *Exp Toxicol Pathol* 2001; 53:271-274.
29. Colbert LH, Davis JM, Essig DA, Ghaffar A, Mayer EP. Tissue expression and plasma concentrations of TNFalpha, IL-1beta, and IL-6 following treadmill exercise in mice. *Int J Sports Med* 2001; 22:261-267.
30. Yoshida Y, Maruyama M, Fujita T, Arai N, Hayashi R, Araya J, Matsui S, Yamashita N, Sugiyama E, Kobayashi M. Reactive oxygen intermediates stimulate interleukin-6 production in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol* 1999; 276: L900-L908.
31. Haddad JJ, Safieh-Garabedian B, Saade NE, Kanaan SA, Land SC. Chemioxyexcitation (delta pO2/ROS)-dependent release of IL-1 beta, IL-6 and TNF-alpha: evidence of cytokines as oxygen-sensitive mediators in the alveolar epithelium. *Cytokine* 2001; 13:138-147.



## MANUSCRITO IV

## Mitochondrial electron transport chain uncoupling in COPD patients with muscle wasting

Roberto A Rabinovich(1), Ricardo Bastos(1), Esther Ardite(1), Mauricio Orozco-Levi(2), Joaquim Gea(2), Jordi Vilaró(3), Joan A Barberà(1), Robert Rodriguez-Roisin(1), José C. Fernandez-Checa(4), Josep Roca(1)

Servei de Pneumologia (ICT)<sup>(1)</sup>, Hospital Clínic, IDIBAPS, Universitat de Barcelona, Barcelona; Muscle and Respiratory System Research Unit, IMIM, CEXS, Universitat Pompeu Fabra; and Respiratory Medicine Department, Hospital del Mar, Barcelona<sup>(2)</sup>; EUIF Blanquerna. Universitat Ramon Llull, Barcelona<sup>(3)</sup>; and Liver Unit (IMD)-CSIC<sup>(4)</sup>, IDIBAPS, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

Supported by Grants La Marató de TV3 - 072(2004); SEPAR (N-2003-500621-D); Comissionat per a Universitats i Recerca de la Generalitat de Catalunya (SGR-00386) and Red Respira - ISCIII - RTIC-03/11

Correspondence: Josep Roca, MD. Servei de Pneumologia. Hospital Clínic. Villarroel 170. Barcelona 08036 Spain. Phone 34-93-227-5540; FAX 34-93-227-5455; E-mail:iroca@clinic.ub.es

**Abstract:** We hypothesized that mitochondrial respiratory chain uncoupling may contribute to limb muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients with low body mass index ( $BMI_L$ ). Seven  $BMI_L$  ( $FEV_1$   $33\pm 6\%$  pred,  $BMI$   $19\pm 1$   $Kg.m^2$ ), eight COPD patients with normal BMI ( $BMI_N$ ) ( $FEV_1$   $47\pm 6\%$  pred,  $BMI$   $29\pm 2$   $Kg.m^2$ ), and seven healthy sedentary individuals ( $FEV_1$   $95\pm 5\%$  pred,  $BMI$   $28\pm 2$   $Kg.m^2$ ) were studied before and after 3-week endurance training. Two open biopsies of the *vastus lateralis* were carried out to assess muscle structure, *in vitro* mitochondrial respiratory function, isolated mitochondria and whole muscle glutathione levels.

Pre-training respiratory chain function (ACR, acceptor control ratio) was lower in  $BMI_L$  ( $2\pm 1$ ) than in both  $BMI_N$  ( $5\pm 1$ ) and controls ( $8\pm 1$ ) (ANOVA  $p<0.01$ ). Arterial oxygenation at rest ( $r=0.70$ ,  $p=0.0016$ ) and at peak exercise ( $r=0.63$ ,  $p=0.009$ ) correlated with ACR which, in turn, showed a negative association with the increase in arterial blood lactate levels at 45 W ( $r=-0.60$ ,  $p=0.01$ ). No training-induced changes in ACR were observed.

We conclude that COPD patients with reduced muscle mass show electron transport chain dysfunction which seems to contribute to low muscle endurance in this subset of patients.

## INTRODUCTION

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD)<sup>1</sup> may generate major extra-pulmonary effects, being skeletal muscle dysfunction a prominent contributor to exercise limitation<sup>2,3</sup>. Limb muscle abnormalities have a multi-factorial nature, including physical inactivity, systemic inflammation/oxidative stress and cell hypoxia<sup>4-6</sup>.

It is acknowledged that COPD severity<sup>1</sup> is associated with an augmented prevalence of systemic effects leading to loss of fat free mass (FFM). The phenomenon has a deleterious impact on health status, increased use of health care resources and poor disease prognosis, which is partly independent of the degree of FEV<sub>1</sub> impairment<sup>7,8</sup>. A better knowledge of the interplay among mechanisms determining limb muscle dysfunction and loss of fat free mass in COPD may enhance our understanding of the functional heterogeneities of the disease which, in turn, may lead to a better management of the patients.

In previous studies<sup>9,10</sup> we reported that physical training improves muscle bioenergetics in COPD patients, irrespective of the staging severity, but they show an abnormal adaptation to muscle oxidative stress generated by repeated high-intensity training sessions. Since altered adaptations of muscle redox status after 8-week endurance training are particularly evident in patients with low body mass index (BMI<sub>L</sub>)<sup>9,10</sup>, we hypothesized an association between loss of FFM and abnormal mitochondrial respiratory chain function in COPD. It is known that the mitochondria are important generators of reactive oxygen species playing a central role to regulate muscle cell regeneration through several oxygen-sensitive pathways some of them mediated by NF-κB<sup>11,12</sup>.

In the current investigation, we explored this hypothesis in eight COPD patients with normal BMI (BMI<sub>N</sub>), seven BMI<sub>L</sub> (< 21 kg.m<sup>2</sup>), and seven healthy sedentary individuals. All were examined at rest, before training, and after 3-weeks of high intensity endurance exercise.

Along with the analysis of the respiratory chain function at baseline, which was the primary objective of the study, we also aimed to explore the time course of training-induced changes in muscle glutathione in the scope of those previously described after an 8-week training period<sup>9,10</sup>. At both time points, baseline and after 3-weeks training, we examined *in vitro* muscle mitochondrial respiratory chain function, and glutathione levels in muscle homogenate and in isolated mitochondria<sup>13</sup>. It is well accepted that cellular training-induced changes can be already evident at 3-weeks<sup>14-16</sup>.

## METHODS

### Study Group

Fifteen clinically stable COPD patients (all men) (Table 1)<sup>17</sup> were included in the study. All patients were on bronchodilators and inhaled corticosteroids. They were clinically stable at the time of the study, without episodes of exacerbation or oral steroid treatment in the previous four

months. None of them presented significant co-morbidities. Seven age-matched healthy sedentary subjects were included as controls. Eight COPD patients were characterized as BMI<sub>N</sub> (BMI  $\geq 21$  kg.m<sup>-2</sup>) and the remaining seven COPD patients were BMI<sub>L</sub> (BMI  $<21$  kg.m<sup>-2</sup>)<sup>18-20</sup>. Selection procedures for inclusion in the study were: a) Clinical assessment; b) Pulmonary function testing (Jaeger, Master Screen; Wüerzburg, Germany)<sup>21;22</sup>; c) Chest X-ray film; and, d) General blood analysis. Measurements to characterize the subjects included: i) Body composition analysis by Bio Impedance (Quantum X, RJL Systems instruments, Clinton Twp., MI - USA); ii) Incremental cycling exercise protocol (CardiO<sub>2</sub> cycle Medical Graphics Corporation, St. Paul, Mn. US)<sup>23</sup>; iii) Left quadriceps static (isometric) and dynamic (isokinetic) strength and endurance (Cybex 6000. Lumex Inc., Ronkonkoma, NY, USA)<sup>24</sup>; and, iv) Muscle morphometry using immunohistochemical procedures<sup>25;26</sup>. All participants were informed of any risks and discomfort associated with the experiment, and written informed consent was obtained in accordance with the Committee on Investigations Involving Human Subjects at the Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, which approved the study.

## Study design

Measurements were performed before and after three weeks of exercise training consisting of exercise sessions five days per week for three weeks. Open muscle biopsies of the “*vastus lateralis*” (~0.8 g) were obtained before (at rest) and after the training period. Muscle specimens were processed as follows: a) approximately ~0.7 g of the muscle sample was included in Krebs’ buffer (pH 7.40) solution for immediate processing assays (homogenate and mitochondrial glutathione concentrations and mitochondrial respiration assays); and, b) ~0.1 g was included in RNA stabilization reagent (RNAlater®, Ambion, Inc., 2130, Woodward street, Austin TX-USA) and stored at -20°C for RNA extraction. Two COPD patients (1 BMI<sub>L</sub> and 1 BMI<sub>N</sub>) and two healthy controls studied at baseline refused to undergo the post-training biopsy (post-training BMI<sub>L</sub> n= 6, BMI<sub>N</sub> n= 7, and controls, n= 5).

## Lung function at rest, body composition and exercise testing

*Lung function.* Forced spirometry, lung volumes, and carbon monoxide transfer capacity (TL<sub>CO</sub>) were measured (Jaeger, MasterScreen; Wüerzburg, Germany) and the results were expressed as a percentage of the reference values obtained in our own laboratory<sup>21;22</sup>. Arterial oxygen tension (PaO<sub>2</sub>), carbon dioxide tension (PaCO<sub>2</sub>), pH and blood lactate were analyzed on a blood gas analyzer (Ciba Corning 800, Medfield, MA, USA).

*Body composition.* Body composition was estimated using single frequency (50 kHz) bio-electrical impedance analysis (Quantum X, RJL Systems instruments, Clinton Twp., MI - USA) while subjects were in supine position. Fat free mass (FFM) was calculated from gender-specific regression equations<sup>27</sup>. Fat free mass index was obtained by dividing FFM in Kg by height in m<sup>2</sup>.

*Incremental exercise protocol.* After placing an arterial catheter (Seldicath, Plastimed, Saint-Leu-La-Forêt, France), subjects were installed on the cycle ergometer with the mouth piece in place. On-line calculations of whole-body  $O_2$  uptake ( $VO_2$ ),  $CO_2$  output ( $VCO_2$ ), minute ventilation ( $V_E$ ), respiratory exchange ratio (RER), and heart rate (HR) were obtained. Arterial blood samples were taken each three minutes throughout the test for analysis of blood gases and lactate. Blood samples were kept on ice until analysis (Ciba Corning 800, Medfield, MA, USA). After three minutes of unloaded pedaling work rate was increased by 5 or 10 Watts per minute. All studies were done using an electromagnetically-braked cyclo-ergometer (CardiO<sub>2</sub> cycle Medical Graphics Corporation, St. Paul, Mn) with a mechanical assistance to overcome the internal frictional resistance.

**TABLE 1**  
CHARACTERISTICS OF THE STUDY GROUPS

	<b>COPD BMI<sub>N</sub></b>	<b>COPD BMI<sub>L</sub></b>	<b>Controls</b>
Age, yrs	<b>63.0 ± 2</b>	<b>61.3 ± 6</b>	<b>61.8 ± 2</b>
Weight, kg	<b>81.0 ± 6</b>	<b>55.4 ± 2**</b>	<b>79.0 ± 5</b>
BMI, kg/m <sup>2</sup>	<b>29.0 ± 2</b>	<b>19.2 ± 1<sup>§</sup></b>	<b>28.0 ± 5</b>
FEV <sub>1</sub> , L	<b>1.6 ± 0.2<sup>†</sup></b>	<b>1.2 ± 0.2<sup>†</sup></b>	<b>3.2 ± 0.2</b>
FEV <sub>1</sub> , % pred	<b>47 ± 6<sup>†</sup></b>	<b>33 ± 6<sup>†</sup></b>	<b>95 ± 5</b>
FVC, % pred	<b>79 ± 5</b>	<b>55 ± 5<sup>§</sup></b>	<b>97 ± 5</b>
TLC, % pred	<b>110 ± 4</b>	<b>108 ± 6</b>	
FRC, % pred	<b>141 ± 9</b>	<b>159 ± 14</b>	
RV, %	<b>159 ± 14</b>	<b>190 ± 19</b>	
DL <sub>CO</sub> , % pred	<b>60 ± 5</b>	<b>39 ± 3<sup>§</sup></b>	
PaO <sub>2, rest</sub> , mmHg	<b>77 ± 5</b>	<b>73 ± 2*</b>	<b>95 ± 6</b>
PaO <sub>2, exer</sub> , mmHg	<b>72 ± 9<sup>†</sup></b>	<b>63 ± 4*</b>	<b>104 ± 14</b>
PaCO <sub>2</sub> , mmHg	<b>42 ± 3</b>	<b>42 ± 2</b>	<b>37.4 ± 2</b>
Watt peak	<b>97 ± 8<sup>†</sup></b>	<b>45 ± 9<sup>§</sup></b>	<b>154 ± 14</b>
VO <sub>2r</sub> peak, mL.min <sup>-1</sup>	<b>1502 ± 126</b>	<b>599 ± 76<sup>§</sup></b>	<b>2049 ± 171</b>
Isometric, Nm	<b>184 ± 16</b>	<b>117 ± 20<sup>††</sup></b>	<b>205 ± 12</b>
Isokinetic <sub>90°</sub> , Nm	<b>118 ± 12</b>	<b>62 ± 12<sup>††</sup></b>	<b>129 ± 11</b>

*Definition of abbreviations: BMI = body mass index; CSA = cross sectional area; Cap./Fiber = capillaries to fiber ratio. Quadriceps measurements: Isometric strength in Nm, Isokinetic strength at 90 degrees.s<sup>-1</sup> in Nm, and Endurance in J.*

*Comparisons with Controls. \* p<0.01, † p<0.001.*

*Comparisons between BMI<sub>N</sub> and BMI<sub>L</sub>. ‡ p<0.01, § p<0.001*

*All comparisons done with ANOVA using a SNK post-hoc analysis of contrasts*

## Muscle Strength

Measurements of maximal voluntary contractions of the left quadriceps were made during static (isometric) and dynamic (isokinetic) contractions against an isokinetic system (Cybex 6000, Lumex Inc., Ronkonkoma, NY, USA). After a previous muscle warm up peak extension torque was evaluated at 60 degrees of knee flexion, the best of five repetitions was taken for the analysis. Isokinetic strength test consisting on a five repetitions at the following different angular speeds (60, 90, 120, 180 and 240 degrees s<sup>-1</sup>). The best peak torque and peak power were taken for the analysis. Also an endurance test was carried out in all patients. This test consisted in a set of 30 knee extensions at a speed of 90 deg s<sup>-1</sup>. The total work done during the repetitions was used to analyse the quadriceps endurance. To ensure the maximal muscle strength in each test, rest periods were introduced between them. Reference values for quadriceps force were used<sup>24</sup>.

## Muscle structure

The muscle was embedded in paraffin and ten-micrometer thick sections were cut, varying the inclination of the holder by 5° increments until the minimum fiber cross-sectional area was obtained, which was defined as truly transverse<sup>25,28</sup>. Consecutive cross-sections were processed by immunohistochemical techniques using monoclonal antibodies directed against myosin heavy chain (MyHC) isoforms type I and type II (MHCs and MHCf clones; Biogenesis, New Fields, Poole, UK). The fiber cross-sectional area (CSA), mean least diameter, and proportions of type I and II fibers were assessed using a light microscope (OLYMPUS, Series BX50F3; Olympus Optical Co., Hamburg, Germany) coupled with an image-digitizing camera (Pixera Studio, Version 1.2; Pixera Corporation, Los Gatos, CA) and a morphometry program (NIH IMAGE, Version 1.60). At least 100 fibers were measured from each biopsy<sup>25</sup>. Fiber diameters between 40 and 80 µm were considered normal<sup>26,29</sup>.

## Mitochondrial respiration

Mitochondria were obtained by percoll centrifugation gradient<sup>30</sup>. The rate of oxygen consumption was measured using Clark-type oxygen electrode (Hansatech Instruments Limited, Norfolk-UK) within one hour after completion of mitochondrial isolation<sup>31</sup>. The respiratory function was analyzed in medium containing 225 mM sucrose, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM KCl, 10 mM Tris, and 5 mM HEPES at 25°C continuously stirred, using an electromagnetic stirrer and bar flea. The mitochondrial suspension was added to the reaction medium and ADP-limited respiration (state 4) was initiated by the addition of (13.5 mM) succinic acid in absence of ADP. Release of state 4 was obtained by the addition of (0.63 mM) ADP, a phosphate acceptor (state 3). Oxidative phosphorylation efficiency was assessed by acceptor control ratio (ACR) by dividing the slope of state 3 to the slope of state 4<sup>32</sup>.

## Assessment of muscle redox status

Fresh muscle samples were homogenized in a buffer consisting in 20 mM Tris, 0.25 M sucrose, 40 mM KCl, 2 mM EGTA and 1mg/ml bovine serum albumin (BSA) and 500  $\mu$ l were separated by glutathione concentration assessment. The rest of the sample served to mitochondrial isolation by percoll centrifugation gradient<sup>30</sup>. In both fractions (homogenate and mitochondria), the two molecular forms of glutathione, reduced (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) were obtained by high-performance liquid chromatography (HPLC) as described previously in detail<sup>33</sup>. An HPLC equipped with a 3-aminopropyl column and an UV spectrophotometric detector (365 nm) was used. GSH and GSSG standards were used to quantify glutathione concentrations.

## Training program

Patients exercised on a cycle ergometer (Jaeger ER 550; Wüerzburg, Germany) five days per week during three weeks. During the cycling sessions, HR was continuously monitored (*Sport-Tester PE 3000 System, Polar Electro, Kemple, Finland*). Patients trained during one-hour sessions for at least an effective period of 30 min. Training sessions were split into small blocks of 2-5 min of continuous cycling which allowed achievement of high intensity exercise. Initial work rates were programmed between the 60 and 75% of the  $W_{peak}$  until reaching 95% of the  $W_{peak}$  at the end of the period.

## Data analysis

Results are expressed as mean $\pm$ SEM. Multiple comparisons were performed using ANOVA or a Kruskal-Wallis test depending upon the distribution of variables. Training effects were analyzed using Student paired-t test. Pearson regression analysis was used to assess univariate correlations. Stepwise multiple regression analyses were used to explore associations between ACR and different baseline variables. Also, we carried out multiple regression analyses of training-induced glutathione changes as dependent variable and different covariates, namely, FEV<sub>1</sub>, peak oxygen uptake, FFM index (FFMi), muscle strength and endurance, and training-induced changes at peak exercise. A p value lower than 0.05 was taken as statistically significant.

## RESULTS

Anthropometric and functional characteristics of COPD patients (BMI<sub>N</sub> n= 8, and BMI<sub>L</sub> n= 7) and controls (n= 7) are indicated in **Table 1**. As expected, FFMi was significantly lower in BMI<sub>L</sub> (17 $\pm$ 1 kg.m<sup>-2</sup>) than in both BMI<sub>N</sub> (21 $\pm$ 1 kg.m<sup>-2</sup>) and controls (22 $\pm$ 1 kg.m<sup>-2</sup>) (p<0.001). None of the patients with normal BMI showed abnormally low FFMi. Patients with normal BMI showed higher FEV<sub>1</sub> % predicted than those with reduced muscle mass. The distribution of patients according to the GOLD<sup>1</sup> classification was as follows: 4 in stage II (3 BMI<sub>N</sub> and 1 BMI<sub>L</sub>); 6 in stage III (4 BMI<sub>N</sub> and 2 BMI<sub>L</sub>), and 5 in stage IV (1 BMI<sub>N</sub> and 4 BMI<sub>L</sub>). The two groups of patients showed



a similar degree of mild arterial hypoxemia, but exercise-induced hypoxemia was slightly more pronounced in BMI<sub>L</sub>. Likewise, BMI<sub>L</sub> had lower exercise tolerance ( $\text{VO}_2$  peak  $11 \pm 1 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) than both BMI<sub>N</sub> ( $19 \pm 2 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) and controls ( $26 \pm 2 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) (ANOVA,  $p < 0.0001$ ).

Quadriceps muscle strength and endurance were also lower in BMI<sub>L</sub> compared to the other two groups (Table 1). Muscle-fiber CSA showed a trend to be higher (24%) in controls than in COPD patients, with identical results between BMI<sub>N</sub> and BMI<sub>L</sub>. But no statistically significant differences among groups were detected. It is of note that muscle endurance normalized by CSA (endurance/CSA ratio) was significantly lower in BMI<sub>L</sub> ( $73 \pm 17 \text{ J}/\mu\text{m}^2$ ) than in both BMI<sub>N</sub> ( $94 \pm 6 \text{ J}/\mu\text{m}^2$ ) and C ( $90 \pm 9 \text{ J}/\mu\text{m}^2$ ), (ANOVA,  $p < 0.001$ ). The ratio muscle strength/CSA was similar among groups (data not shown). Figure 1 indicates that BMI<sub>L</sub> presented earlier arterial blood lactate ([La]) release than both BMI<sub>N</sub> and controls. As expected, exercise-induced increases in [La] showed a strong association with  $\text{VO}_2$  peak ( $r = 0.84$ ,  $p < 0.0001$ ) and Watts peak ( $r = 0.85$ ,  $p < 0.0001$ ). After 3 weeks, a clear training-induced effect on  $\Delta[\text{La}]$  was showed in COPD (BMI<sub>N</sub> and BMI<sub>L</sub>) patients. In BMI<sub>L</sub>, [La] fell from  $3.5 \pm 0.4 \text{ nmol.L}^{-1}$  to  $2.1 \pm 0.2 \text{ nmol.L}^{-1}$  at iso- $\text{VO}_2$  (100% of pre-training peak  $\text{VO}_2$ ,  $p = 0.05$ ) which corresponded to a workload of 45 W. Likewise, [La] decreased from  $7.9 \pm 0.8 \text{ nmol.L}^{-1}$  to  $5.2 \pm 0.6 \text{ nmol.L}^{-1}$  after training in BMI<sub>N</sub> ( $p < 0.05$ ). No training-induced changes in [La] were observed in controls (from  $8.7 \pm 1.4$  to  $8.1 \pm 0.8 \text{ nmol.L}^{-1}$ ). Early [La] release persisted in BMI<sub>L</sub> after training.

### Mitochondrial respiration

Individual figures for ACR at baseline are illustrated in Figure 2. On average, ACR at baseline was significantly lower in BMI<sub>L</sub> ( $2.2 \pm 1$ ) than in both BMI<sub>N</sub> ( $5.3 \pm 1$ ) and in healthy sedentary subjects ( $8.2 \pm 1$ ) (ANOVA  $p < 0.01$ ). Abnormal ACR ( $< 3$ ) was seen in five out of seven BMI<sub>L</sub> and in only two out of eight BMI<sub>N</sub>, whereas it was absent in the controls. Arterial  $\text{PO}_2$  correlated significantly with ACR, both at rest ( $r = 0.70$ ,  $p = 0.0016$ ) and at peak exercise ( $r = 0.63$ ,  $p = 0.009$ ). Exercise-induced increase in [La] from rest to 45 watts was negatively correlated with mitochondrial respiratory function ( $r = -0.60$ ,  $p = 0.01$ ). Moreover, a positive correlation was shown between ACR and the endurance/CSA ratio both before ( $r = 0.40$ ,  $p = 0.07$ ) and after ( $r = 0.50$ ,  $p = 0.04$ ) training.

After training, no significant changes in ACR ( $\Delta\text{ACR}$ ) were observed in the three subsets (BMI<sub>L</sub>,  $2 \pm 1$ ; BMI<sub>N</sub>,  $1 \pm 2$ ; and, controls  $-1 \pm 2$ ).

### Muscle glutathione levels

No differences among groups were observed in muscle homogenate concentrations of GSH (BMI<sub>L</sub>  $7 \pm 1$ ; BMI<sub>N</sub>  $9 \pm 2$ ; and, controls  $5 \pm 1 \text{ nmol/mg}$ ), GSSG and total glutathione at baseline. After training, a pattern of GSH consumption was observed in BMI<sub>N</sub> and controls. In these two subsets, we observed a marked individual variability. In contrast, none of the BMI<sub>L</sub> patients showed training-induced GSH changes (Figure 3). The multiple regression analyses indicated that only FFMi was significantly associated with training-induced glutathione adaptations:

$\Delta$ GSH ( $r=-0.46$ ,  $p=0.056$ ),  $\Delta$ GSSG ( $r=-0.55$ ,  $p=0.018$ ) and  $\Delta$ Total glutathione ( $r=-0.47$ ,  $p=0.046$ ). No differences in mitochondrial glutathione levels were observed among groups at baseline and after training.

## DISCUSSION

The current study provides original evidence of mitochondrial respiratory chain uncoupling in COPD patients with reduced muscle mass (**Figure 2**), not seen in BMI<sub>N</sub>, nor in healthy sedentary subjects. The BMI<sub>L</sub> group presented low muscle endurance after correction by muscle mass (muscle endurance/CSA ratio) which showed a moderate but significant correlation with ACR before and after training.

### Potential mechanisms

Although speculative, it can be hypothesized that electron transport chain dysfunction in BMI<sub>L</sub> may indicate an abnormal mitochondrial adaptation to long-term repeated episodes of cell hypoxia. The association between ACR and arterial hypoxemia seems to support this contention. We acknowledge, however, that causality can not be established from the current study.

Relationships between poor arterial oxygenation and systemic manifestations of COPD, namely low FFMi and high TNF $\alpha$  plasma levels, have been reported by other authors<sup>34,35</sup>. Moreover, abnormal mitochondrial respiratory chain function has been identified as a contributing mechanism to limb muscle dysfunction in patients with tissue hypoxia due to chronic peripheral arterial obstruction<sup>36,37</sup>.

In addition to potential perturbations of the main determinants of systemic oxygen flow, COPD patients are prone to present low muscle O<sub>2</sub> conductance<sup>38</sup> from capillaries to mitochondria and muscle O<sub>2</sub> supply-O<sub>2</sub> demand heterogeneities. These two factors may generate cell hypoxia during exercise, even in absence of overt arterial hypoxemia. In spite of the fact that low O<sub>2</sub> conductance and inequality of O<sub>2</sub> supply-O<sub>2</sub> demand can not be directly assessed, there is evidence supporting a role for muscle hypoxia during sub-maximal work rate.

A first indirect set of data comes from the abnormally high muscle O<sub>2</sub> flow at a given sub-maximal work rate seen in COPD patients<sup>39,40</sup>. It most likely indicates augmented cellular oxygen demand due to mechanical inefficiency, not explainable by abnormal ergonomics during exercise<sup>39,40</sup>. It has been recently suggested that nitroso-redox imbalance in the cardiovascular system may play a central role in different chronic disorders<sup>41-43</sup> (congestive heart failure, COPD, diabetes) triggering tissue hypoxia due to mismatching between O<sub>2</sub> flow-O<sub>2</sub> demand. Further research, however, is still needed to elucidate the mechanisms by which red blood cells act as oxygen-responsive transducers of nitric oxide bioactivity, as well as to identify the clinical impact of this pathway.

Moreover, it is well known that in healthy sedentary young subjects<sup>44,45</sup> mitochondrial oxidative capacity limits maximum oxygen uptake, at difference with athletes in whom VO<sub>2</sub>max is clearly

limited by  $O_2$  transport<sup>46</sup>. Likewise, it seems reasonable to hypothesize that muscle energy demand during heavy exercise in sedentary old COPD patients may exceed mitochondrial oxidative capacity leading to abnormal exercise-induced oxidative stress seen in these patients<sup>9,47-50</sup>. Because mitochondria are the major consumers of molecular oxygen, they stand as one of the most important generators of reactive oxygen species therefore constituting potential targets for therapeutic interventions in disease states in which oxidative stress originates from these organelles.

Maltais et al.<sup>51,52</sup> reported altered muscle oxidative capacity at the level of Krebs cycle in COPD patients, irrespective of their muscle mass status. These abnormalities partly reversed after endurance training<sup>51</sup>. The activity of oxidative enzymes of the Krebs cycle is usually associated with mitochondrial volume and the changes in these two characteristics may reflect muscle plasticity to physical training. Despite our training program only lasted three weeks, we showed clear effects in the patients, as indicated by a significant post-training fall in arterial [La] at iso- $VO_2$ . This observation is consistent with previous studies<sup>14,15</sup> showing short-term training effects at cellular level.

### Muscle glutathione levels

At difference with other disorders<sup>15</sup>, the current research showed that GSH information obtained in muscle homogenate was not improved by measurements performed in isolated mitochondria. This is a relevant methodological finding because it simplifies further studies in the field.

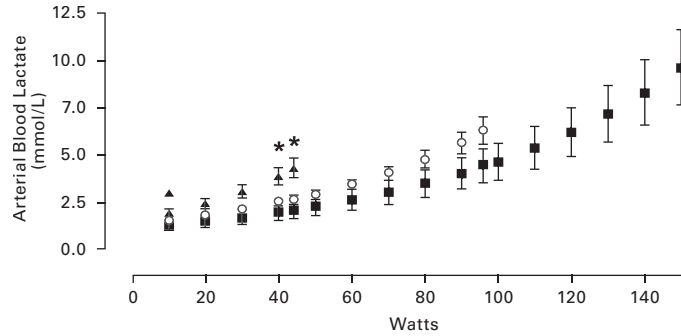
The current study does not reproduce the pattern of muscle GSH adaptations to training seen in a previous report<sup>9</sup> wherein healthy sedentary subjects significantly increased muscle GSH levels after 8-weeks high intensity endurance training. Muscle redox adaptations were modest in  $BMI_N$  and absent in  $BMI_L$ <sup>9,10</sup>. Precisely, the latter subset of patients showed a training-induced decrease in muscle GSH<sup>10</sup> after 8-weeks.

In the current study, we confirm that  $BMI_L$  after a 3-weeks endurance program show different training-induced GSH changes than both  $BMI_N$  and controls (**Figure 3**). It can be speculated that, at this time point (3-weeks training), glutathione consumption seen in  $BMI_N$  and in controls is due to exercise-induced ROS production. Mitochondrial respiratory chain abnormalities in  $BMI_L$  might be transiently associated with lower rate of ROS production, but the scenario observed in  $BMI_L$  after 3-weeks of training is not sustainable according to the previous results obtained after an 8-weeks training program<sup>9,10</sup>. With the current results, the analysis of the time course of GSH adaptations becomes an issue to be explored with a specific study design including muscle redox measurements carried out before training, at mid-term and after completion of an 8-weeks training program in the same set of subjects.

### Methodological aspects

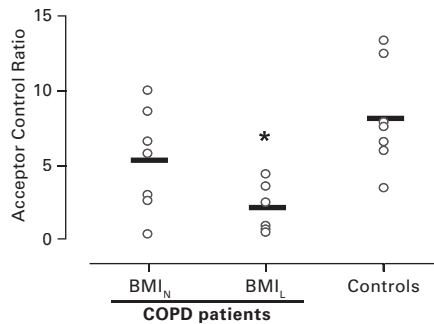
The rather invasive approach of the study including two open muscle biopsies accounts for the small sample size which may constitute a limitation for some of the areas explored. In particular, the lack of significant post-training changes in ACR should be taken cautiously. A type II error

**FIGURE 1**  
ARTERIAL BLOOD LACTATE LEVELS  
DURING CYCLING EXERCISE



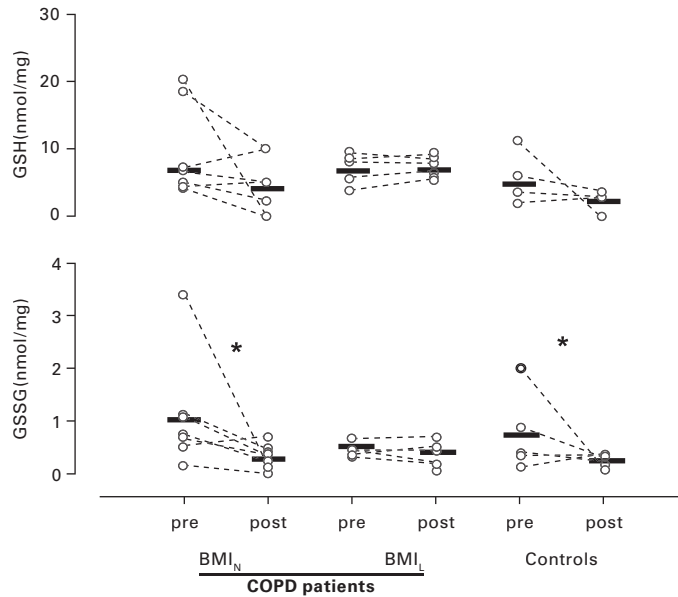
**Figure 1.** Mean arterial blood lactate levels during incremental cycling exercise. The graph displays pre-training arterial blood lactate levels in COPD patients with low BMI (BMI<sub>L</sub>, triangles), COPD patients with normal BMI (BMI<sub>N</sub>, circles), and healthy sedentary subjects (Controls, squares) during incremental cycling exercise. Early lactate release was seen in BMI<sub>L</sub> patients compared to both BMI<sub>N</sub> and Controls (\* ANOVA  $p < 0.05$ ).

**FIGURE 2**  
BASELINE MITOCHONDRIAL RESPIRATION



**Figure 2.** Baseline "in vitro" mitochondrial respiratory chain function. Individual (circles) and mean group (solid lines) data for acceptor control ratio (ACR). Significant differences in ACR were shown between BMI<sub>L</sub> and both BMI<sub>N</sub> and Controls (\* ANOVA  $p < 0.05$ ). Data of one COPD patient with normal BMI (BMI<sub>N</sub>) is missing because of technical problems.

**FIGURE 3**  
MUSCLE HOMOGENATE GLUTATHIONE LEVELS



**Figure 3.** Muscle homogenate glutathione levels before and after training. Individual (circles) and mean group (solid lines) data, pre- and post-training, for reduced glutathione (GSH, upper panel) and oxidized glutathione (GSSG, bottom panel) in COPD patients: BMI<sub>N</sub> and BMI<sub>L</sub> and in Controls. See text for further explanations (\*  $p < 0.05$ ).

cannot be ruled out as ACR clearly augmented in 3 out of the 6 patients with reduced BMI, despite the short duration of the training program. Moreover, mean post-training ACR values were similar among BMI<sub>L</sub>, BMI<sub>N</sub> and controls.

The duration of training constituted a non-conventional choice in the study design. As indicated above, the main reason for a 3-weeks training period was to explore the time course of muscle GSH adaptations taking as a reference the available data<sup>9,10</sup> at the completion of a standard 8-weeks training program.

Patients with BMI<sub>L</sub> showed more advanced disease than those with BMI<sub>N</sub>. It is well known that the two phenomena (low BMI and severe FEV<sub>1</sub> impairment) are not fully independent and their association is linked to poor disease prognosis. Patients with COPD may present abnormal fat to

lean body mass ratio such that BMI may not properly indicate patient's muscle mass. This fact does not seem to alter the interpretation of the current results since none of the COPD patients with normal BMI presented abnormally low FFMi. The relative contribution of muscle wasting on the study findings was estimated by multiple regression analysis taking FFMi as covariate.

One intriguing finding in the study was that functional abnormalities (ACR) were not accompanied by substantial alterations in muscle structure. We understand that the analysis of muscle structure-function relationships requires further attention due to several confounding factors, namely physical de-conditioning and geographical-ethnic differences that may partly explain the heterogeneity of the results reported in the literature.

In summary, the current investigation clearly identifies mitochondrial respiratory chain uncoupling in COPD patients with low muscle mass. Whether the phenomenon occurs only in a subset of susceptible advanced COPD patients or it is a general feature of end-stage disease needs to be elucidated. Further research is also required to explore the underlying post-transcriptional mechanisms that are likely shared by other chronic conditions.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Felip Burgos, Conxi Gistau and Jose Luis Valera and all the technical staff of the Lung Function Laboratory for their skillful support during the study. Elena Gimeno, Nestor Sanchez, Carlos Hernando and Isaac Diaz from EUIF Blanquerna are acknowledged for their outstanding work supervising the training sessions.

## References

1. 2004. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease - Updated 2004. [www.goldcopd.com](http://www.goldcopd.com).
2. Gosselink, R., T. Troosters, and M. Decramer. 1996. Peripheral muscle weakness contributes to exercise limitation in COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 153:976-980.
3. Saey, D., R. Debigare, P. Leblanc, M. J. Mador, C. H. Cote, J. Jobin, and F. Maltais. 2003. Contractile leg fatigue after cycle exercise: a factor limiting exercise in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 168:425-430.
4. ATS/ERS statement. 1999. "Skeletal Muscle Dysfunction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease". *Am J Respir Crit Care Med* 159:S1-S40.
5. Agusti, A. G., A. Noguera, J. Sauleda, E. Sala, J. Pons, and X. Busquets. 2003. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 21:347-360.
6. Wouters, E. F., E. C. Creutzberg, and A. M. Schols. 2002. Systemic effects in COPD. *Chest* 121:127S-130S.
7. Jones, P. W. 1995. Issues concerning health-related quality of life in COPD. *Chest* 107 Suppl.:187S-193S.
8. Connors, A. F., N. V. Dawson, C. Thomas, F. H. Harrel Jr, N. Desbiens, W. J. Fulkerson, P. Kussin, P. Bellamy, L. Goldman, and W. A. Knaus. 1996. Outcomes following acute exacerbation of severe chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 154:959-967.
9. Rabinovich, R. A., E. Ardlite, T. Troosters, N. Carbó, J. Alonso, J. M. Gonzalez de Suso, J. Vilaró, J. A. Barberà, M. Figueras, J. M. Argiles, J. C. Fernandez Checa, and J. Roca. 2001. Reduced muscle redox capacity after endurance training in COPD patients. *Am J Respir Crit Care Med* 164:1114-1118.

10. Rabinovich, R. A. and J. Roca. 2002. Is COPD also a disease of skeletal muscle?, author reply. *Am J Respir Crit Care Med.* 165:1337-1338.
11. Chandel, N. S., W. X. Trzyna, D. S. McClintock, and P. T. Schumacker. 2000. Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol* 165:1013-1021.
12. Ardite, E., J. A. Barbera, J. Roca, and J. C. Fernandez-Checa. 2004. Glutathione depletion impairs myogenic differentiation of murine skeletal muscle C2C12 cells through sustained NF-kappaB activation. *Am J Pathol.* 165:719-728.
13. Fernandez-Checa, J. C., A. Colell, and C. Garcia-Ruiz. 2002. S-Adenosyl-L-methionine and mitochondrial reduced glutathione depletion in alcoholic liver disease. *Alcohol* 27:179-183.
14. Chen, Y. W., M. J. Hubal, E. P. Hoffman, P. D. Thompson, and P. M. Clarkson. 2003. Molecular responses of human muscle to eccentric exercise. *J Appl.Physiol* 95:2485-2494.
15. Spina, R. J., M. M. Chi, M. G. Hopkins, P. M. Nemeth, O. H. Lowry, and J. O. Holloszy. 1996. Mitochondrial enzymes increase in muscle in response to 7-10 days of cycle exercise. *J Appl.Physiol* 80:2250-2254.
16. Bickel, C. S., J. Slade, E. Mahoney, F. Haddad, G. A. Dudley, and G. R. Adams. 2005. Time course of molecular responses of human skeletal muscle to acute bouts of resistance exercise. *J Appl.Physiol* 98:482-488.
17. Celli, B. R. and W. MacNee. 2004. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 23:932-946.
18. Baarends, E. M., A. M. Schols, W. D. Van Marken Lichtenbelt, and E. F. Wouters. 1997. Analysis of body water compartments in relation to tissue depletion in clinically stable patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutri* 65:88-94.
19. Heijdra, Y. F., V. Pinto-Plata, R. Frants, J. Rassulo, L. Kenney, and B. R. Celli. 2003. Muscle strength and exercise kinetics in COPD patients with a normal fat-free mass index are comparable to control subjects. *Chest* 124:75-82.
20. Schols, A. M. and E. F. Wouters. 2000. Nutritional abnormalities and supplementation in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin.Chest Med.* 21:753-762.
21. Roca, J., F. Burgos, J. Sunyer, M. Saez, S. Chinn, J. M. Antó, R. Rodriguez-Roisin, Ph. H. Quanjer, D. Nowak, and P. Burney. 1998. Reference values for forced spirometry. *Eur Respir J* 11:1354-1362.
22. Roca, J., F. Burgos, J. A. Barberà, J. Sunyer, R. Rodriguez-Roisin, J. Castellsague, J. Sanchis, J. M. Antó, P. Casan, and J. L. Clausen. 1998. Prediction equations for plethysmographic lung volumes. *Respir.Med.* 92:454-460.
23. Roca, J. and Whipp, B. J. eds., 1997. Clinical Exercise Testing. Eur Respir Monograph. European Respiratory society Journals Ltd, Sheffield, UK, p 164.
24. Decramer, M., L. M. Lacquet, R. Fagard, and P. Rogiers. 1994. Corticosteroids contribute to muscle weakness in chronic airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 150:11-16.
25. Dubowitz, V. and M. Brooke 1973. Muscle biopsy: a modern approach. In V. Dubowitz and M. Brooke, editors Major Problems in Neurology Saunders, London. p 74-85.
26. Hards, J. M., W. D. Reid, R. L. Parry, and P. D. Pare. 1990. Respiratory muscle fiber morphometry. Correlation with pulmonary function and nutrition. *Chest* 97:1037-1044.
27. Kotler, D. P., S. Burastero, J. Wang, and R. N. Pierson, Jr. 1996. Prediction of body cell mass, fat-free mass, and total body water with bioelectrical impedance analysis: effects of race, sex, and disease. *Am J Clin.Nutr.* 64:489S-497S.
28. Poole, D. C., R. L. Lieber, and O. Mathieu-Costello. 1994. Myosin and actin filament lengths in diaphragms from emphysematous hamsters. *J.Appl.Physiol* 76:1220-1225.
29. Brooke, M. H. and W. K. Engel. 1969. The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types. 4. Children's biopsies. *Neurology* 19:591-605.
30. Dunkley, P. R., J. W. Heath, S. M. Harrison, P. E. Jarvie, P. J. Glenfield, and J. A. Rostas. 1988. A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. *Brain Res.* 441:59-71.
31. Colell, A., C. Garcia-Ruiz, J. M. Lluís, O. Coll, M. Mari, and J. C. Fernandez-Checa. 2003. Cholesterol impairs the adenine nucleotide translocator-mediated mitochondrial permeability transition through altered membrane fluidity. *J Biol.Chem.* 278:33928-33935.
32. Ferreira, J., L. Gil, A. Stutzin, and F. Orrego. 1985. Effects of guanethidine on electron transport and proton movements in rat heart, brain and liver mitochondria. *Biochem.Pharmacol.* 34:2507-2512.
33. Fariss, M. W. and D. J. Reed. 1987. High-performance liquid chromatography of thiols and disulfides: dinitrophenol derivatives. *Methods Enzymol* 143:101-109.
34. Takabatake, M., H. Nakamura, S. Abe, T. Hino, H. Saito, H. Yuki, S. Kato, and H. Tomoike. 1999. Circulating leptin in

- patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 159:1215-1219.
35. Takabatake, M., H. Nakamura, H. Abe, S. Inoue, T. Hino, H. Saito, H. Yuki, S. Kato, and H. Tomoike. 2000. The Relationship between Chronic Hypoxemia and Activation of the Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  System in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1179-1184.
  36. Brass, E. P., H. Wang, and W. R. Hiatt. 2000. Multiple skeletal muscle mitochondrial DNA deletions in patients with unilateral peripheral arterial disease. *Vasc. Med* 5:225-230.
  37. Pipinos, I. I., V. G. Sharov, A. D. Shepard, P. V. Anagnostopoulos, A. Katsamouris, A. Todor, K. A. Filis, and H. N. Sabbah. 2003. Abnormal mitochondrial respiration in skeletal muscle in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc. Surg.* 38:827-832.
  38. Simon, M., P. Leblanc, J. Jobin, M. Desmeules, M. J. Sullivan, and F. Maltais. 2001. Limitation of lower limb  $\dot{V}O_2$  during cycling exercise in COPD patients. *J Appl. Physiol* 90:1013-1019.
  39. Sala, E., J. Roca, R. M. Marrades, J. Alonso, J. M. Gonzalez de Suso, A. Moreno, J. Barbera, J. Nadal, Ll. Jover, R. Rodriguez-Roisin, and P. D. Wagner. 1999. Effects of endurance training on skeletal muscle bioenergetics in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 159:1726-1734.
  40. Richardson, R. S., B. T. Leek, T. P. Gavin, L. J. Haseler, S. R. Mudaliar, R. Henry, O. Mathieu-Costello, and P. D. Wagner. 2004. Reduced mechanical efficiency in chronic obstructive pulmonary disease but normal peak  $\dot{V}O_2$  with small muscle mass exercise. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 169:89-96.
  41. Hare, J. M. 2004. Nitroso-redox balance in the cardiovascular system. *N. Engl. J Med* 351:2112-2114.
  42. Hare, J. M. 2003. Nitric oxide and excitation-contraction coupling. *J Mol. Cell Cardiol.* 35:719-729.
  43. Singel, D. J. and J. S. Stamler. 2004. Blood traffic control. *Nature* 430:297.
  44. Sala, E., E. A. Noyszewski, J. M. Campistol, R. Marrades, S. Dreha, J. V. Torregrosa, J. S. Beers, P. D. Wagner, and J. Roca. 2001. Impaired muscle oxygen transfer in patients with chronic renal failure. *Am J Physiol* 280:R1240-R1248.
  45. Haseler, L. J., A. P. Lin, and R. S. Richardson. 2004. Skeletal muscle oxidative metabolism in sedentary humans:  $^{31}\text{P}$ -MRS assessment of  $\text{O}_2$  supply and demand limitations. *J Appl. Physiol* 97:1077-1081.
  46. Richardson, R. S., E. A. Noyszewski, K. F. Kendrick, J. S. Leigh, and P. D. Wagner. 1995. Myoglobin  $\text{O}_2$  desaturation during exercise: Evidence of limited  $\text{O}_2$  transport. *J Clin Invest* 96:1916-1926.
  47. Miwa, S. and M. D. Brand. 2003. Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling. *Biochem. Soc. Trans.* 31:1300-1301.
  48. Barreiro, E., J. Gea, J. M. Corominas, and S. N. Hussain. 2003. Nitric oxide synthases and protein oxidation in the quadriceps femoris of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J Respir Cell Mol. Biol.* 29:771-778.
  49. Koechlin, C., A. Couillard, D. Simar, J. P. Cristol, H. Bellet, M. Hayot, and C. Prefaut. 2004. Does oxidative stress alter quadriceps endurance in chronic obstructive pulmonary disease? *Am. J Respir Crit Care Med.* 169:1022-1027.
  50. Agusti, A., M. Morla, J. Sauleda, C. Saus, and X. Busquets. 2004. NF- $\kappa$ B activation and iNOS upregulation in skeletal muscle of patients with COPD and low body weight. *Thorax* 59:483-487.
  51. Maltais, F., P. Leblanc, C. Simard, J. Jobin, C. Bérubé, J. Bruneau, L. Carrier, and R. Belleau. 1996. Skeletal muscle adaptation to endurance training in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 154:442-447.
  52. Allaire, J., F. Maltais, J. F. Doyon, M. Noel, P. Leblanc, G. Carrier, C. Simard, and J. Jobin. 2004. Peripheral muscle endurance and the oxidative profile of the quadriceps in patients with COPD. *Thorax* 59:673-678.



# Resumen de resultados

## MANUSCRITO I

### **Reduced Muscle Redox Capacity after Endurance Training in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease**

Después de ocho semanas de entrenamiento físico, los sujetos sanos participantes en este estudio como grupo control doblaron la concentración de GSH en el homogenado del *vastus lateralis*. Por el contrario, los pacientes con EPOC no aumentaron los niveles de GSH e incrementaron los de GSSG indicando que el entrenamiento físico disminuyó la capacidad antioxidante muscular.

Cabe señalar que los pacientes con EPOC incrementaron la expresión del  $\gamma$ GCS-ARNm en el *vastus lateralis* post-entrenamiento mientras que se observó el efecto opuesto en los sujetos sanos. A pesar de estas diferencias en los mecanismos de adaptación del sistema redox, tanto los pacientes con EPOC como los sujetos control mostraron un efecto beneficioso del entrenamiento físico en lo que respecta a tolerancia al ejercicio (medida como incremento de la carga pico y consumo de oxígeno pico), y en la capacidad oxidativa muscular (medida con espectroscopia del  $^{31}\text{P}$ ).

## MANUSCRITO II

### **Training Depletes Muscle Glutathione in COPD Patients with Low Body Mass Index**

El análisis de los cambios del estado redox muscular post-entrenamiento separando los pacientes en dos grupos: índice de masa corporal bajo ( $BMI_L$ ) y BMI normal ( $BMI_N$ ), mostró que los primeros presentaban una depleción de los niveles musculares de GSH mientras que en los segundos el GSH presentaba una tendencia al incremento sin alcanzar la significación estadística. Cabe señalar que el comportamiento del GSH muscular en los pacientes con índice de masa corporal normal se diferencia claramente del observado en los sujetos sedentarios sanos en los que los niveles de GSH post-entrenamiento prácticamente se doblaron. Estos resultados demuestran que la alteración en la capacidad de adaptación del sistema del glutathione es más exagerada en el grupo de pacientes  $BMI_L$ . Nuevamente, ambos grupos de pacientes muestran un incremento de los niveles de  $\gamma$ GCS-ARNm con el entrenamiento.

## MANUSCRITO III

### **Increased Tumour Necrosis Factor- $\alpha$ Plasma Levels during Moderate-Intensity Exercise in COPD Patients**

La expresión de ARNm de  $TNF\alpha$  (ARNm- $TNF\alpha$ ) se encuentra incrementada en el músculo esquelético periférico de pacientes con EPOC en comparación con sujetos sanos de igual edad y sexo. Si bien no se observaron diferencias en las concentraciones plasmáticas de  $TNF\alpha$  entre pacientes y sujetos sanos, el ejercicio de moderada intensidad (40 % de la capacidad máxima de ejercicio sostenida durante 11 minutos) generó un incremento de los niveles plasmáticos de  $TNF\alpha$  en los pacientes con EPOC

no observado en los sujetos control. El entrenamiento físico no produjo modificaciones en los niveles de expresión muscular de ARNm-TNF $\alpha$  ni en las concentraciones plasmáticas de TNF $\alpha$ .

No se observaron diferencias en las concentraciones plasmáticas de interleucina-6 (IL-6), otra de las citocinas potencialmente relacionadas con la pérdida de masa muscular, ni en las concentraciones plasmáticas de los receptores hidrosolubles para el TNF $\alpha$ , entre pacientes con EPOC y sujetos controles. Tampoco se observaron cambios en las concentraciones plasmáticas de IL-6 o de los receptores para el TNF $\alpha$  en relación al ejercicio o al entrenamiento.

## MANUSCRITO IV

### **Mitochondrial Electron Transport Chain Uncoupling in COPD Patients with Muscle Wasting**

La funcionalidad de la cadena respiratoria mitocondrial (acceptor control ratio, ACR) presentó una alteración significativa en los pacientes BMI<sub>L</sub> en comparación con los BMI<sub>N</sub> y los sujetos sanos sedentarios. El ACR se correlacionó de forma altamente significativa con el nivel de PaO<sub>2</sub> tanto a nivel basal como al finalizar el ejercicio incremental con cicloergómetro. También se correlacionó de forma inversa con el incremento precoz de ácido láctico durante el ejercicio.

Se encontraron diferencias en la adaptación del estado redox muscular a las tres semanas de entrenamiento entre el grupo BMI<sub>L</sub> y los pacientes BMI<sub>N</sub> y el grupo Control. Mientras que los pacientes BMI<sub>L</sub> presentaron una respuesta uniforme sin cambios en el estado redox muscular en relación al entrenamiento, tanto los pacientes BMI<sub>N</sub> como el grupo control presentaron un patrón de comportamiento similar con una gran variabilidad inter-individual. En estos dos grupos (BMI<sub>N</sub> y controles) se observó una disminución de los niveles de GSSG concomitantemente con una tendencia a disminuir la concentración de GSH y glutation total (GSH+GSSG). Se

utilizaron análisis de regresión lineal múltiple para explorar las asociaciones entre los cambios producidos por el entrenamiento en las concentraciones de GSH, GSSG y glutathion total como variables dependientes y diversas variables independientes relacionadas con la función pulmonar, tolerancia al ejercicio y composición corporal. Todas las variables independientes incluidas en los modelos fueron excluidas excepto el índice de FFM (FFMi) que mostró una asociación consistente con los cambios en las concentraciones de GSH, GSSG y glutathion total inducidas por el entrenamiento.



### EFFECTOS DEL ENTRENAMIENTO SOBRE EL SISTEMA GLUTATION

En el primer trabajo de esta tesis se demuestra que la regulación del sistema del glutatión se encuentra alterada en el músculo esquelético periférico de pacientes con EPOC. El incremento de la capacidad antioxidante evidenciada en el grupo control debe ser interpretado como un mecanismo de adaptación al estrés oxidativo provocado por las sucesivas sesiones de ejercicio que componen el programa de entrenamiento. Por el contrario, el entrenamiento físico disminuyó la capacidad antioxidante en el músculo de los pacientes con EPOC. Asimismo, el incremento de la expresión del  $\gamma$ GCS-ARNm, enzima que constituye el paso limitante en la síntesis de GSH y es regulada alostéricamente por éste, no se traduce en un incremento de la concentración de GSH.

Aunque en la síntesis de novo de GSH intervienen diversos mecanismos, de hecho existen dos factores que influyen de forma predominante: a) la cantidad y actividad de la  $\gamma$ GCS presente en la célula, regulada por feed-back negativo que ejerce el propio GSH sobre la misma; y, b) la biodisponibilidad de sustratos, particularmente L-cisteína.

El incremento de la expresión del  $\gamma$ GCS-ARNm es indicativa de que la transcripción del gen tiene lugar en este caso. Sin embargo los datos disponibles en el presente estudio no permiten dilucidar el tipo de alteración post-transcripcional que impide que esta señal se traduzca en un incremento de la concentración de GSH. Basados en datos de estudios anteriores, podemos especular que existe alguna alteración a nivel de

la disponibilidad de sustratos necesarios para la adecuada síntesis de GSH<sup>214;215</sup>.

A pesar de que la expresión de  $\gamma$ GCS-ARNm disminuye con el entrenamiento en los sujetos control, estos incrementan los niveles de GSH en el homogenado del vastus lateralis. La alta correlación entre los cambios de  $\gamma$ GCS-ARNm y GSH provocados por el entrenamiento indicaría que el incremento en los niveles de GSH podría reprimir la transcripción de la  $\gamma$ GCS en este grupo.

En la introducción se ha mencionado la existencia de un incremento del estrés oxidativo sistémico en pacientes con EPOC, especialmente durante las exacerbaciones. El papel potencial de este fenómeno en la etiopatogenia de la disfunción muscular en la EPOC, adquiere especial relevancia en situaciones en las que la regulación de los mecanismos antioxidantes como el sistema del glutatión se encuentra alterada como se demuestra en este primer trabajo de la tesis. En este contexto, la reacción de moléculas pro-oxidantes con lípidos y proteínas<sup>194</sup> puede interferir en el funcionamiento adecuado del músculo (adecuada contractilidad) y alterar los fenómenos regenerativos musculares dando lugar a la pérdida de masa muscular observada en algunos de estos pacientes. El hecho de que la n-acetil cisterna (NAC), un precursor de la síntesis de glutatión, mejore la resistencia muscular en pacientes con EPOC previniendo el estrés oxidativo inducido por el ejercicio<sup>216</sup> es indicativo del papel de los ROS en la disfunción muscular esquelética de los pacientes con EPOC. Asimismo, el papel beneficioso de la NAC daría soporte a la hipótesis de que el déficit de sustratos constituiría un factor relevante en la disfunción muscular de la EPOC.

Por otro lado, la modificación de proteínas estructurales celulares<sup>194</sup> generada por los ROS, puede mediar mecanismos de proteólisis muscular<sup>191;192</sup> favoreciendo la pérdida de masa muscular.

## RELACIONES ENTRE ESTRÉS OXIDATIVO Y PÉRDIDA DE MASA MUSCULAR

En el segundo trabajo de la tesis se incrementó el número de pacientes con EPOC del primer estudio a expensas de enfermos con índice de masa corporal bajo (BMI<sub>L</sub>). El objetivo era efectuar un análisis diferenciado de las adaptaciones redox al entrenamiento muscular entre BMI<sub>L</sub> y BMI<sub>N</sub>. Este estudio demuestra que la alteración en la capacidad de adaptación del sistema del glutatión es más exagerada en el grupo

de pacientes con BMI<sub>L</sub>. La pérdida de masa muscular en estos pacientes probablemente refleja la activación de mecanismos fisiopatológicos ya mencionados en la introducción. El mantenimiento de los niveles de GSH constituiría una importante estrategia celular para prevenir el daño muscular producido por el incremento de radicales libres potencialmente citotóxicos. La alteración en los mecanismos de adaptación de sistemas antioxidantes pone en evidencia la desventaja del músculo de estos pacientes, particularmente del subgrupo BMI<sub>L</sub>. Éste hallazgo abre nuevos interrogantes en lo que respecta al potencial efecto deletéreo del entrenamiento muscular en los pacientes con pérdida de masa muscular.

El ejercicio localizado en miembros inferiores incrementa los niveles plasmáticos de TBARs (*thiobarbituric reactive substances*) en pacientes con EPOC en comparación con sujetos sanos<sup>217</sup>. Esta expresión de estrés oxidativo a nivel plasmático parece ser el reflejo del producido por el ejercicio a nivel muscular<sup>218</sup>.

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento de la secuencia temporal de la adaptación del estado redox en respuesta al entrenamiento muscular, en el cuarto trabajo de esta tesis se llevó a cabo el análisis de las concentraciones de GSH y GSSG en el homogenado muscular y en el compartimiento mitocondrial a las tres semanas de entrenamiento. Los resultados indican que las mediciones efectuadas en el compartimiento mitocondrial no aportan información de interés en relación a la obtenida en el homogenado muscular.

El patrón de comportamiento del GSH en el cuarto manuscrito debe ser analizado en relación a los cambios en el estado redox producidos por un programa de ocho semanas de entrenamiento descritos en el primer y segundo estudios. La disminución de los niveles de GSH, GSSG y glutation total en los pacientes BMI<sub>N</sub> y los sujetos control podrían ser interpretados como un incremento en el consumo de este tiol intracelular por parte de moléculas oxidantes producidas durante las sesiones de entrenamiento. En los controles, la extensión del entrenamiento a 8 semanas generaría los fenómenos adaptativos descritos anteriormente con el consiguiente aumento de GSH, que apenas se observaría en los pacientes con BMI<sub>N</sub>.

En cambio, la estabilidad de la concentración muscular de GSH observada en los pacientes con BMI<sub>L</sub> a las tres semanas de entrenamiento no se mantiene en el tiempo, sino que daría lugar a un progresivo deterioro del potencial redox muscular perfectamente observable a las 8 semanas. La posible relación entre este patrón de

comportamiento y una anomalía en el acoplamiento de la cadena respiratoria mitocondrial será discutido más adelante.

El aumento de GSSG a las 8 semanas de entrenamiento observado en los pacientes con EPOC en relación a los controles sugiere que el incremento de la producción de moléculas pro oxidantes no fue adecuadamente neutralizado por los sistemas de defensa antioxidante dejando al músculo entrenado más susceptible al estrés oxidativo. Estos resultados, junto con los observados en el segundo protocolo, plantean la necesidad de profundizar en el conocimiento de los efectos del entrenamiento muscular en los pacientes con EPOC y pérdida de masa muscular. Ante la evidencia de los efectos beneficiosos del entrenamiento al ejercicio en pacientes con EPOC, no parece verosímil plantearse desterrar esta herramienta terapéutica. Por el contrario, en estos momentos el principal reto radica en el hallazgo de formulas de entrenamiento físico que permitan asegurar la sostenibilidad de los efectos del entrenamiento en el tiempo con un coste asumible por el sistema sanitario. Se trata, por tanto, de desarrollar estrategias de despliegamiento extensivo de los programas de entrenamiento en fases relativamente tempranas de la enfermedad. En lo que respecta al potencial efecto deletéreo del entrenamiento sobre el sistema redox muscular, especialmente en los pacientes con  $BMI_L$ , está en el terreno de investigaciones futuras el conocer el impacto clínico de las alteraciones en la capacidad antioxidante inducida por el entrenamiento, cuales son las vías metabólicas afectadas y como podemos desarrollar estrategia de prevención del problema. En este sentido, la eventual administración de suplementos nutricionales o farmacológicos tendientes a limitar el estrés oxidativo generado por el ejercicio debe ser objeto de futuros estudios.

## INTERACCIONES ENTRE INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO.

En el tercer trabajo se demuestra que la expresión de ARNm de  $TNF\alpha$  (ARNm- $TNF\alpha$ ) se encuentra incrementada en el cuádriceps de pacientes con EPOC en comparación con sujetos sanos de igual edad y sexo. Si bien no se observaron diferencias en las concentraciones plasmáticas de  $TNF\alpha$  entre pacientes y sujetos sanos, el ejercicio de moderada intensidad (40 % de la capacidad máxima de ejercicio sostenida durante 11 minutos) generó un incremento de los niveles plasmáticos de  $TNF\alpha$  en los pacientes con EPOC no observado en los sujetos control. El entrenamiento físico



no produjo modificaciones en los niveles de expresión muscular de ARNm-TNF $\alpha$  ni en las concentraciones plasmáticas de TNF $\alpha$ . En este trabajo no se observaron diferencias entre pacientes con EPOC y controles, en las concentraciones plasmáticas de interleucina-6 (IL-6), otra de las citocinas potencialmente relacionadas con la pérdida de masa muscular, ni en los niveles plasmáticos de los receptores hidrosolubles para el TNF $\alpha$ . Tampoco se observaron cambios en las concentraciones plasmáticas de IL-6 o de los receptores para el TNF $\alpha$  en relación al ejercicio o al entrenamiento.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), originalmente denominada “caquectina” por su reconocida acción catabólica<sup>219</sup>, ha sido extensamente asociada a la pérdida de masa muscular que ocurre en diversas patologías como el cáncer, infecciones crónicas, artritis reumatoidea, y otras enfermedades crónicas<sup>220</sup>.

Takabatake y colaboradores demostraron que en pacientes con EPOC los niveles séricos de TNF $\alpha$  se encuentran elevados en comparación con sujeto sanos<sup>221</sup>. El índice de masa corporal de estos pacientes fue significativamente menor que el del grupo control y por debajo de los valores de la normalidad. Asimismo, pacientes con EPOC y peso corporal por debajo del normal presentan niveles séricos de TNF $\alpha$  elevado en comparación con pacientes con EPOC y peso corporal normal<sup>107</sup>. Esta elevación de los niveles séricos de TNF $\alpha$  podría ser reflejo una producción exagerada de esta citocina por parte de monocitos circulantes<sup>147</sup>. Recientemente Greiwe y colaboradores han demostrado que el TNF $\alpha$  contribuye a la pérdida de masa muscular asociada con la edad<sup>222</sup>. Más aun, estos mismos autores demuestran que el entrenamiento físico disminuye la expresión de TNF $\alpha$  en el músculo esquelético de sujetos añosos. A diferencia de lo observado por Greiwe y colaboradores, el entrenamiento al ejercicio al que fueron sometidos los sujetos del estudio presentado en esta tesis doctoral, no disminuyó la expresión de ARNm-TNF $\alpha$  ni en los pacientes con EPOC ni en los sujetos sanos. Asimismo, el entrenamiento tampoco modificó el incremento anormal de los niveles plasmáticos de TNF $\alpha$  producidos por el ejercicio moderado en los pacientes con EPOC.

En el tercer estudio de la tesis, el índice de masa corporal de los pacientes se halla dentro de los valores normales. Por ello, no esperábamos encontrar diferencias significativas en los niveles plasmáticos basales de TNF $\alpha$  en relación a los controles<sup>21</sup>. Desafortunadamente, no se realizaron mediciones de composición corporal (FFM) de los pacientes.

En sujetos sanos está bien establecido que tanto el ejercicio intenso como el ejercicio prolongado incrementan los niveles de citocinas pro-inflamatorias, particularmente IL-6<sup>223</sup>. La expresión de ARNm de IL-6 aumenta en el músculo esquelético de las piernas en corredores de maratón, coincidiendo con el aumento de los niveles plasmáticos de IL-6<sup>224</sup>. El nivel de ejercicio realizado por los sujetos del presente estudio ha sido de intensidad moderada y de corta duración, lo que explica los resultados obtenidos en estas variables.

La ausencia de efecto del entrenamiento en los niveles de ARNm-TNF $\alpha$  en los sujetos sanos de nuestro estudio, a diferencia de Greiwe y colaboradores<sup>222</sup>, puede ser atribuida a las diferencias en el entrenamiento. Estos autores<sup>222</sup> efectuaron un programa de estiramientos musculares de 3 meses de duración, seguido de 3 meses de entrenamiento muscular con 3 sesiones semanales. En definitiva, se trata de un programa de mayor duración y volumen que el empleado en la presente tesis doctoral.

En este tercer estudio, se identifica un punto que plantea interrogantes. Es en relación al origen del TNF $\alpha$  durante el ejercicio moderado en los pacientes con EPOC. Se han efectuado diferentes hipótesis al respecto: 1) músculos en actividad<sup>224</sup>, 2) estímulo simpático sobre diversos órganos<sup>223</sup>, 3) tejido adiposo<sup>225</sup>; y, 4) células mononucleares circulantes<sup>226</sup>. Puesto que la segunda biopsia muscular fue obtenida inmediatamente después de finalizar el ejercicio, el tiempo transcurrido parece ser insuficiente para que la síntesis de novo de TNF $\alpha$  tenga lugar<sup>227</sup>. Sin embargo, es razonable especular que el ejercicio pudo haber provocado la liberación de TNF $\alpha$  “preformado” a nivel muscular a través de mecanismos de regulación post-transcripcional. El aumento de los niveles de moléculas pro-oxidantes puede inducir la liberación de citocinas a nivel post-transcripcional, independientemente de la síntesis de ARNm<sup>228</sup>. Dado que el músculo esquelético de pacientes con EPOC presenta un incremento en los niveles de oxidación proteica, reflejando una situación de estrés oxidativo<sup>194</sup>, podríamos especular que la situación antes descrita puede verse favorecida en este grupo de pacientes. La alteración del potencial redox en la EPOC podría aumentar la susceptibilidad de estos pacientes para incrementar la liberación de TNF $\alpha$  muscular. Desafortunadamente en el presente estudio no se analizaron los niveles proteicos de TNF $\alpha$  a nivel muscular mediante western blot con lo cual está hipótesis queda en el terreno de lo especulativo. También se desconoce el impacto que pudiera tener el incremento de esta citocina durante el ejercicio.

A pesar de las limitaciones que pudiera tener el presente estudio, quedan claramente definidos dos aspectos fundamentales en lo que respecta al TNF $\alpha$ . Por un lado, la mayor expresión muscular de ARNm-TNF $\alpha$  en los pacientes con EPOC en comparación con los sujetos sanos. Por otro lado, el incremento anómalo de las concentraciones plasmáticas de TNF $\alpha$  con el ejercicio moderado observado en estos mismos pacientes. Se ha de destacar también la ausencia de cambios con el entrenamiento físico en la expresión de ARNm-TNF $\alpha$  en el músculo esquelético y en el incremento de TNF $\alpha$  plasmático producido por el ejercicio moderado. Otro aspecto importante de este tercer trabajo es que el hallazgo de un aumento en la expresión de ARNm-TNF $\alpha$  en el *vastus lateralis* de los pacientes con EPOC, abre una nueva posibilidad al origen in situ del TNF $\alpha$ . En este sentido, investigaciones recientes indican que el TNF $\alpha$  tiene funciones de mediador endógeno de los mecanismos de adaptación muscular mediante efectos autocrino-paracrinos<sup>229</sup>. Li y colaboradores demuestran que el TNF $\alpha$  se encuentra elevado en cultivos de células musculares durante las 24 h iniciales de la diferenciación<sup>230</sup>.

En la introducción se mencionan, entre otros factores, los fenómenos inflamatorios sistémicos presentes en los pacientes con EPOC en la génesis de la disfunción muscular. Se especula que el incremento de los niveles plasmáticos de moléculas pro-inflamatorias puedan afectar al músculo. De todas las citocinas relacionadas con el músculo es el TNF $\alpha$  la más extensamente estudiada. Se trata de un polipéptido capaz de promover la respuesta inmune y antitumoral<sup>231</sup>. Es liberada fundamentalmente por macrófagos circulantes aunque otras células, incluyendo el músculo esquelético, son capaces de sintetizar TNF $\alpha$ <sup>232;233</sup>.

La respuesta de las células musculares al TNF $\alpha$  está mediada por dos receptores de membrana, el TNFR1 (55kDa) y el TNFR2 (75kDa)<sup>234</sup>. De estos, el TNFR1 sería el receptor involucrado en la pérdida de masa muscular mediada por TNF $\alpha$ <sup>235;236</sup>. A través la interacción con sus receptores específicos, el TNF $\alpha$  desencadena una compleja cascada de eventos de señalización intracelular<sup>237</sup>. Estas vías de señalización incluyen a los ROS y a los RNS como mediadores<sup>231</sup>. Estas moléculas pro-oxidantes son claves para la señalización de los eventos intracelulares desencadenados por el TNF $\alpha$  a nivel del músculo esquelético<sup>148;238;239</sup>. Existen al menos tres mecanismos dependientes de la acción de oxidantes mediante el cual el TNF $\alpha$  puede relacionarse con la disfunción muscular: 1) alteración en la capacidad contráctil muscular, 2) la pérdida de proteínas musculares promovida por el TNF $\alpha$ ; y, 3) alteración en el proceso de diferenciación muscular.

Diversos estudios recientes indican que la función muscular puede estar comprometida por la elevación crónica de TNF $\alpha$  sin cambios musculares ultraestructurales<sup>240</sup>. Así, numerosos artículos demuestran que el TNF $\alpha$  inhibe la contractilidad muscular<sup>240-244</sup>. La administración sistémica de TNF $\alpha$  disminuye la fuerza muscular en animales anestesiados<sup>241</sup>. Este efecto del TNF $\alpha$  sobre la capacidad contráctil muscular ha sido demostrado también en tejido muscular *in vitro*<sup>242</sup>. El efecto del TNF $\alpha$  sobre la contractilidad muscular se atenúa con la administración de antioxidantes<sup>240</sup> sugiriendo que esta disminución de la fuerza provocada por el TNF $\alpha$  estaría mediada por un incremento en el nivel de oxidantes intracelulares. El artículo de Greiwe y colaboradores<sup>222</sup> refuerza el hecho de que la expresión de TNF $\alpha$  está regulada por la contractilidad muscular.

Por su demostrada acción catabólica y por el hecho de que los niveles plasmáticos de esta citocina se encuentran incrementados en pacientes con EPOC y bajo peso corporal, el TNF $\alpha$  es, entre las citocinas pro-inflamatorias, el primer candidato a estar involucrado en la etiopatogenia de la pérdida de masa muscular en la EPOC. Los efectos catabólicos indirectos del TNF $\alpha$  han sido largamente reconocidos. De esta forma, el TNF $\alpha$  puede alterar los niveles plasmáticos de diversas hormonas que regulan el crecimiento muscular como la insulina, glucagon, hormonas tiroideas, glucocorticoides y catecolaminas<sup>245-247</sup>. También existe evidencia de que el TNF $\alpha$  puede afectar al músculo de manera directa. Esta citocina afectaría el trofismo muscular tanto por efecto sobre células musculares diferenciadas como por interferencia en los procesos de diferenciación muscular. Solo o en combinación con otras citocinas, el TNF puede inducir pérdida de proteínas contráctiles como la cadena pesada de miosina en células musculares diferenciadas<sup>148;248;249</sup>.

Numerosos estudios demuestran que este efecto estaría mediado por la activación del factor de transcripción nuclear kB (NFkB)<sup>148;149;238;248;250</sup>. A diferencia de la mayoría de los factores de transcripción, el NFkB reside fundamentalmente en el citoplasma de la célula en forma inactiva por su unión a la proteína inhibitoria de NFkB (I $\kappa$ B). El I $\kappa$ B enmascara la secuencia de localización nuclear del NFkB. La translocación del NFkB al núcleo ocurre cuando el I $\kappa$ B es fosforilado en sus residuos de serina causando su poliubiquitinación y proteólisis subsiguiente por el proteasoma 26S<sup>251</sup>.

Esta vía de señalización intracelular parece ser redox sensible. Sen y colaboradores<sup>238</sup> demuestran que la depleción intracelular de GSH potencia la activación de NFkB

inducida por el TNF $\alpha$ . Más aun, recientemente se ha demostrado el papel clave del GSH en el proceso normal de diferenciación muscular<sup>252</sup>. Nuevamente, la disminución de la capacidad de síntesis de GSH observada en estos pacientes, particularmente en el grupo con bajo BMI, cobra especial interés en este contexto. Li y colaboradores demuestran que la activación del NF $\kappa$ B en presencia de TNF $\alpha$  es mediada por un incremento de ROS<sup>148</sup> que activarían a la protein-kinasa C (PKC) que fosforilaría el I $\kappa$ B permitiendo su degradación por el proteasoma 26S<sup>239</sup>. Además, estos<sup>239</sup> y otros autores<sup>253</sup> demuestran que estos ROS se originan en la cadena respiratoria mitocondrial.

El NF $\kappa$ B indudablemente estimula la pérdida proteica a través de su efecto en la regulación de la expresión génica. De estos genes, los involucrados con mayor probabilidad en este proceso son los ligados a la vía ubiquitin-proteasoma. La mayoría de las proteínas intracelulares degradadas por éste sistema son previamente marcadas para ser destruídas mediante la unión covalente a una pequeña proteína llamada ubiquitina. La ubiquitina es inicialmente activada mediante la conversión del extremo carboxílico de la misma a un thiol ester mediante una enzima conocida como E1. A su vez la E1 une la ubiquitina a una proteína transportadora (proteína E2). Finalmente la ubiquitina es unida a la proteína diana por ligasas ubiquitina-proteína (proteína E3). La modificación sufrida por la proteína marca a esta para ser degradada por el complejo proteolítico proteasoma 26S. Existe una gran variedad de transportadores de ubiquitina (E2) dentro de la célula. La selectividad de este mecanismo reside fundamentalmente en las proteínas E2-E3 involucradas en el proceso de marcado. Los diferentes pares E2-E3 tienen una alta selectividad para determinadas proteínas específicas.

Diversos estudios indican que el TNF $\alpha$  incrementa la expresión de ARNm-ubiquitina y niveles proteicos de ubiquitina en el músculo esquelético<sup>254,255</sup>. Li y colaboradores demuestran que el incremento de la ubiquitinación producida por el TNF $\alpha$  en el músculo esquelético es mediada por un incremento en la expresión de la proteína E2 UbcH2. Esta acción del TNF $\alpha$  es, a su vez, mediada por NF $\kappa$ B<sup>256</sup>. Recientemente Agustí y colaboradores demuestran que la actividad del NF $\kappa$ B se encuentra incrementada en pacientes con EPOC y bajo índice de masa corporal<sup>197</sup>.

Además de su efecto catabólico sobre el músculo, el TNF $\alpha$  es un potente inhibidor del proceso de miogénesis<sup>149,248</sup>. Este proceso estaría mediado por una disminución de la expresión del factor de la determinación de la biogénesis (MyoD) inducida por NF $\kappa$ B. La diferenciación muscular representa el paradigma de programa de múltiples pasos

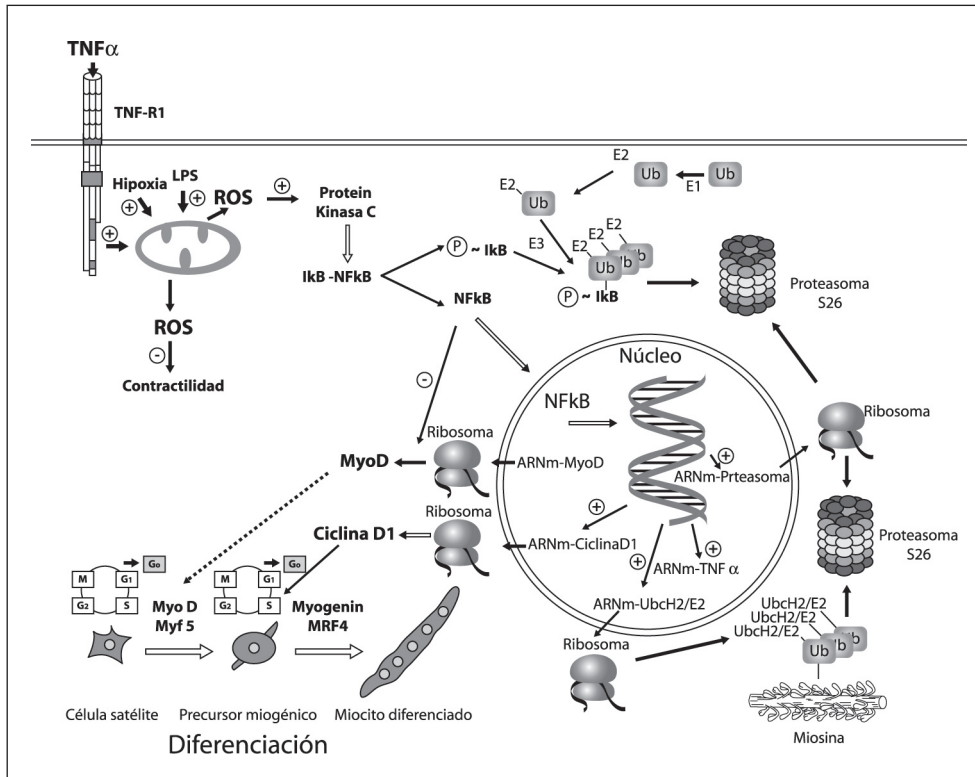
regulado a nivel de la transcripción génica. La diferenciación de las células satélite en fibras musculares adultas comprende la fusión de las precursoras musculares en miotubos multinucleados, un proceso regulado por la activación en cascada de un programa genético muscular<sup>257</sup>. Los factores reguladores de la miogénesis (del inglés myogenic regulatory factors, MRFs) son parte de una superfamilia de factores de transcripción b helix-loop-helix (bHLH) involucrados en la diferenciación de la célula satélite. Se encuentran dentro de esta familia el MyoD<sup>258</sup>, Myf5<sup>259</sup>, Myogenin<sup>260</sup> y el MRF4<sup>261</sup>. Los MRFs primarios, MyoD y Myf5, están involucrados en la “determinación” de la célula satélite mientras que los secundarios, myogenin y MRF4, son requeridos como factores de “diferenciación”. Este programa muscular requiere la expresión cronológica ordenada de estos factores.

En condiciones fisiológicas el NFκB es un importante regulador del proceso de diferenciación muscular. Numerosos autores han observado que los mioblastos en proliferación muestran una actividad alta del NFκB que disminuye durante el proceso de diferenciación<sup>149;262;263</sup>. El NFκB es un potente inhibidor de la diferenciación manteniendo los mioblastos en un estado de indiferenciación. Recientemente ha sido demostrado que uno de los mecanismos mediante los cuales el NFκB bloquea la diferenciación es a través de la regulación de la ciclina D1, un potente inhibidor de la miogénesis<sup>262</sup>. A su vez, el NFκB regula la expresión de MyoD, posiblemente a través de un mecanismo post transcripcional<sup>248;264</sup>.

Además del estímulo que el TNFα ejerce en la activación del NFκB, este factor de transcripción regula, entre muchos otros genes, la expresión de la propia citocina<sup>265</sup> indicando la existencia de un círculo de feedback entre este factor de transcripción y el TNFα. Es interesante el hecho de que los ROS, además de mediar la activación del NFκB inducida por el TNFα también son los responsables de mediar el incremento de la expresión de NFκB en respuesta a estímulos como la hipoxia o la exposición a lipopolisacáridos (endotoxinas) que inducen un aumento en la expresión de TNFα en cultivos celulares<sup>253</sup>. Estos mecanismos intracelulares de señalización pueden verse claramente en la **Figura 3**.

Los pacientes con EPOC se encuentran potencialmente expuestos a situaciones de hipoxia tisular. Un porcentaje no despreciable de pacientes presentan hipoxemia en reposo o en situaciones especiales como durante el sueño o el ejercicio. Más aún, la alteración de la capilarización del músculo descrita por algunos autores, permite

especular con la posibilidad de que pudiesen darse situaciones de hipoxia tisular aún en ausencia de hipoxemia. Como se mencionara anteriormente, Takabatake y colaboradores demuestran los niveles circulantes de  $TNF\alpha$  se encuentran elevados en pacientes con EPOC e índice de masa corporal bajo, en comparación con sujetos sanos con índice de masa corporal normal. Aún más interesante es el hecho de que la concentración plasmática de  $TNF\alpha$  se correlacionó de manera inversa con los niveles de  $PaO_2$  arterial en estos pacientes.



**Figura 3.** Interacciones entre  $TNF\alpha$  y ROS en la disfunción muscular en la EPOC. Al interactuar con el  $TNF-R1$ , el  $TNF\alpha$  desencadena una serie de mecanismos intracelulares que conllevan la producción de ROS a nivel mitocondrial. Estos activarían una proteínaquinasa C que fosforilaría al  $I\kappa B$  que sería degradado por el sistema proteasoma S26 luego de ser poliubiquitinado. El  $NF\kappa B$  se transloca al núcleo donde interactúa con el ADN favoreciendo la transcripción de diversos genes entre los cuales destacamos el del propio  $TNF\alpha$ , genes relacionados con el sistema ubiquitin-proteasoma, el de la ciclina D1 y el de la proteína  $UbcH2/E2$ . El incremento de la síntesis de proteínas relacionadas con el sistema ubiquitin-proteasoma favorecerían la degradación de proteínas como la cadena pesada de miosina. Asimismo, la ciclina D1 es un potente inhibidor del ciclo celular a nivel G1-S. El  $NF\kappa B$  actuaría además inhibiendo la estabilización del MyoD por mecanismos post-transcripcionales. Estos dos últimos aspectos actuarían inhibiendo el proceso de diferenciación muscular. A su vez, la hipoxia y los lipopolisacáridos (LPS) constituyen otras fuentes de producción de ROS a nivel mitocondrial.

Con todo, la relación entre moléculas oxidantes y  $\text{TNF}\alpha$  puede adquirir una especial relevancia en situaciones en donde la capacidad antioxidante muscular se encuentra alterada, como se demuestra en el primer trabajo de esta tesis. En este contexto debe analizarse la ausencia de cambios con el entrenamiento físico en la expresión de ARNm- $\text{TNF}\alpha$  a nivel muscular y en el incremento de los niveles plasmáticos de  $\text{TNF}\alpha$  producidos por el ejercicio moderado en el grupo de pacientes EPOC incluido en el tercer trabajo presentado en esta tesis doctoral.

## RELACIÓN ENTRE DESACOPLAMIENTO DE LA CADENA RESPIRATORIA Y DISFUNCIÓN MUSCULAR

En el cuarto trabajo de la tesis, el análisis de composición corporal mediante bioimpedancia reveló una disminución significativa de la FFM en el grupo de pacientes con bajo BMI en comparación con los sujetos control y los EPOC  $\text{BMI}_N$ . Asimismo, estos sujetos presentaron una marcada intolerancia al ejercicio (ejercicio incremental en cicloergómetro), un incremento temprano de los niveles plasmáticos de lactato durante el mismo protocolo de ejercicio y una disminución de la fuerza y la resistencia muscular estadísticamente significativa con respecto a los otros dos grupos. Cabe mencionar que la fuerza muscular corregida por la superficie muscular medida como *cross-sectional area* (CSA) a partir del análisis histológico de las muestras de músculo, no presentó diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, la resistencia muscular normalizada por la CSA mantuvo las diferencias significativas entre los  $\text{BMI}_L$  y los otros dos grupos estudiados. Esto demuestra que la capacidad de desarrollar fuerza muscular depende de manera importante de la masa muscular. Sin embargo, este no parece ser el caso de la resistencia, o capacidad de sostener el esfuerzo, que depende fundamentalmente de la capacidad de transporte y utilización muscular del oxígeno.

Este estudio profundiza en las posibles explicaciones a estos fenómenos. De esta forma, el hallazgo más significativo de este estudio fue, sin duda, la existencia de una alteración en el acoplamiento de la cadena respiratoria mitocondrial en los  $\text{BMI}_L$  en comparación con los  $\text{BMI}_N$  y sujetos C. Esto se sustenta en el hallazgo de una marcada disminución del ACR (acceptor control ratio), un parámetro de eficiencia de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Es interesante el hecho de que el ACR se correlacionó de manera inversa y altamente significativa con el nivel de  $\text{PaO}_2$ , tanto a nivel basal como al finalizar



el ejercicio incremental en cicloergómetro. Asimismo, éste índice de acoplamiento de la cadena respiratoria también se correlacionó inversa y significativamente con el incremento precoz de los niveles de ácido láctico durante el ejercicio.

En definitiva, este estudio demuestra una marcada diferencia en la tolerancia al ejercicio conjuntamente con un incremento de la producción de lactato a iso-carga. La asociación entre ACR y el incremento en la producción de ácido láctico permite especular que la ineficiencia en la cadena respiratoria mitocondrial comprometa la adecuada producción de ATP del músculo favoreciendo una activación precoz del metabolismo láctico. Hasta el momento, la ineficiencia muscular representada por el incremento temprano del ácido láctico ha sido atribuida a factores como la disminución de la actividad de enzimas del metabolismo oxidativo muscular ampliamente demostrada en la literatura<sup>74;82</sup>. Además, el incremento en el consumo de oxígeno a igual carga de trabajo demostrado por, al menos, dos trabajos anteriormente publicados<sup>64;74</sup> ha sido atribuido al incremento de la proporción de fibras tipo II existente en el músculo periférico de los pacientes con EPOC. Esta es la primera evidencia de la existencia de alteraciones en la cadena respiratoria mitocondrial en el músculo esquelético de este tipo de pacientes. Otro factor destacable es la asociación entre el ACR y la resistencia muscular normalizada por la CSA tanto a nivel basal como después del entrenamiento. A diferencia de la alteración en la fuerza muscular observada en los pacientes con bajo BMI, que puede ser atribuida a la disminución de la CSA, la persistencia de las diferencias en la resistencia corregida por la CSA y su asociación con el ACR establecen una clara relación entre la disfunción mitocondrial y la disminución de la resistencia muscular.

Las tres semanas de entrenamiento físico tuvieron un efecto positivo en la función muscular demostrado por una disminución del incremento de los niveles plasmáticos de ácido láctico durante el ejercicio incremental en cicloergómetro en los pacientes BMI<sub>L</sub> en comparación con los BMI<sub>N</sub> y el grupo C. Sin embargo, no existieron cambios en el ACR en relación con el entrenamiento en ninguno de los tres grupos. Cualquier conclusión al respecto debe ser sumamente prudente por la corta duración del programa de entrenamiento y el limitado número de pacientes estudiados.

En cuanto a los posibles mecanismos íntimos que generan esta alteración de la cadena respiratoria mitocondrial, la asociación entre los niveles de PaO<sub>2</sub> y ACR permite especular en una posible relación causal hipoxia celular-alteración en la

fosforilación oxidativa. Además, es bien conocido que una elevada producción de peroxinitritos, se relaciona con el desacople de la fosforilación oxidativa<sup>266</sup>. En este sentido, los niveles de 3-nitrotirosina se encuentran incrementados en el músculo esquelético de pacientes con EPOC<sup>194</sup>. Más aun, la expresión de la sintetasa inducible de óxido nítrico (iNOS) se encuentra elevada en el músculo esquelético de pacientes con EPOC y bajo BMI<sup>197</sup>. El estrés oxidativo/nitrosativo puede causar peroxidación de lípidos de las membranas celulares. Esto puede incrementar la permeabilidad de las mismas. En el caso de la membrana interna mitocondrial puede llevar a una fuga de iones, resultando en un daño de la función mitocondrial.

En este sentido, ha sido mencionado en la literatura que el desacoplamiento de la cadena respiratoria mitocondrial puede constituir un mecanismo de defensa antioxidante al asociarse a una disminución de la producción de especies reactivas de oxígeno<sup>204</sup>. De esta forma, el desacoplamiento de la cadena respiratoria reportado en el cuarto estudio de esta tesis doctoral, podría estar ocasionado por un incremento de peroxinitritos en el músculo esquelético que ha sido descrito en pacientes con EPOC y BMI bajo<sup>194</sup>. Si esto es así, las diferencias, anteriormente discutidas, entre BMI<sub>N</sub>, BMI<sub>L</sub> y controles en el comportamiento de las concentraciones de glutatión en relación al entrenamiento, podrían relacionarse a una disminución en la producción de ROS asociada al ejercicio en los pacientes con bajo índice de masa corporal ocasionado por este desacoplamiento de la cadena respiratoria mitocondrial<sup>204</sup>. Es importante destacar, de acuerdo a los resultados del primer y segundo trabajo, que este potencial mecanismo de defensa antioxidante parecería ser superado por la persistencia del estímulo prolongado, tal como sugieren los resultados del entrenamiento de 8 semanas de duración.



## Resumen

La intolerancia al ejercicio que sufren los pacientes con EPOC se debe no solo a factores pulmonares sino a la disfunción de músculos periféricos presente en este grupo de pacientes que se engloba dentro de los denominados efectos sistémicos de la enfermedad. La disfunción muscular en pacientes con EPOC responde a dos fenómenos diferenciados pero íntimamente relacionados como son la alteración en la función muscular normal y la pérdida de masa muscular que ocurre en un subgrupo de pacientes. La rehabilitación basada en el entrenamiento muscular es una herramienta terapéutica orientada a restaurar la función muscular normal. Ésta consigue incrementar la tolerancia al ejercicio conjuntamente con la mejoría de la función muscular caracterizada por un incremento en la capacidad de desarrollar fuerza, una disminución de la fatigabilidad del músculo y un incremento en la resistencia. Esto impacta positiva y significativamente en la calidad de vida de estos pacientes. Sin embargo, el entrenamiento físico en pacientes con EPOC raramente alcanza a normalizar la función muscular por completo. Por ello, el entrenamiento constituye una herramienta que permite profundizar en el entendimiento de los mecanismos etiopatogénicos responsables de la disfunción muscular periférica que afecta a estos pacientes. La disfunción muscular responde a causas multifactoriales. Entre ellas, factores inflamatorios como determinadas citocinas, fundamentalmente el  $\text{TNF}\alpha$  y el estrés oxidativo han cobrado relevancia en los últimos años. Esta tesis profundiza en el análisis de las relaciones entre el efecto del entrenamiento físico en pacientes con EPOC y el estado redox muscular. También examina la relación entre estrés oxidativo y la pérdida de masa muscular que tiene lugar en un subgrupo de pacientes con EPOC.

Finalmente, la tesis explora las interacciones entre inflamación y estrés oxidativo. Asimismo, se describen por primera vez alteraciones en la eficiencia de la fosforilación oxidativa en pacientes con índice de masa corporal disminuido y su relación con los cambios fisiopatológicos responsables de la disfunción muscular.

Del cuidadoso análisis de los resultados obtenidos a lo largo de estos años, plasmados en los cuatro trabajos presentados en la tesis podemos elaborar una serie de conclusiones que se detallan en el apartado siguiente.



## Conclusiones

1) Los mecanismos de adaptación al estrés oxidativo asociados al ejercicio se encuentran alterados en el músculo esquelético de pacientes con EPOC. A diferencia del grupo control, después de un programa de entrenamiento de ocho semanas de duración, los pacientes con EPOC presentan una alteración en la capacidad de incrementar las concentraciones de GSH concomitantemente con un incremento en el GSSG. Dicha alteración es más evidente en los pacientes con bajo índice de masa corporal.

2) El incremento en la expresión de ARNm- $\gamma$ GCS en el músculo de estos pacientes podría indicar que la alteración del estado redox muscular en los pacientes con EPOC no parece responder a una mala regulación transcripcional sino a alteraciones de carácter post-transcripcional.

3) Los pacientes con EPOC presentan un incremento en la expresión de ARNm-TNF $\alpha$  en el músculo periférico. Existe además un moderado incremento de las concentraciones plasmáticas de TNF $\alpha$  en relación al ejercicio de moderada intensidad, no observado en sujetos sanos.

4) Los pacientes con EPOC e índice de masa corporal bajo presentan un desacoplamiento de la cadena respiratoria mitocondrial, que se relaciona con los niveles de hipoxemia. Ello permite especular sobre posibles relaciones causales entre hipoxia tisular, estrés oxidativo y el fenómeno de pérdida de masa muscular observado en un subgrupo de pacientes con EPOC.

5) Asimismo, una alteración en el adecuado acoplamiento de la cadena respiratoria mitocondrial puede explicar, en parte, el incremento temprano de los niveles de ácido láctico sanguíneo que ocurre en los pacientes con EPOC y  $BMI_L$  durante el ejercicio.



## Perspectivas de futuro

Las conclusiones de la tesis generan nuevos interrogantes que constituyen retos para investigaciones futuras. De este modo, es importante conocer cual es la extensión de las alteraciones en la capacidad antioxidante inducida por el entrenamiento, cuales son las vías afectadas y en que grado esta deficiencia está ligada a un régimen específico de programa entrenamiento para poder establecer estrategias futuras dirigidas a modelar los mismos a las necesidades particulares de cada paciente. En este sentido, la eventual administración de suplementos nutricionales o farmacológicos tendientes a limitar el estrés oxidativo generado por el ejercicio debe ser objeto de futuros estudios.







# Bibliografía

1. Celli, B. R. and W. MacNee. 2004. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J.* 23:932-946.
2. Pauwels, R. A., A. S. Buist, P. M. Calverley, C. R. Jenkins, and S. S. Hurd. 2001. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med.* 163:1256-1276.
3. Plan de Salud. Madrid: Secretaría General Técnica. Centro de Publicaciones. Ministerio de Sanidad y Consumo, 1995; Nipo 351-95-02-7.
4. Killian, K. J., P. Leblanc, D. H. Martin, E. Summers, N. L. Jones, and E. J. M. Campbell. 1992. Exercise capacity and ventilatory, circulatory, and symptom limitation in patients with chronic airflow limitation. *Am Rev Respir Dis.* 146:935-940.
5. Gosselink, R., T. Troosters, and M. Decramer. 1996. Peripheral muscle weakness contributes to exercise limitation in COPD. *Am J Respir Crit Care Med.* 153:976-980.
6. Saey, D., R. Debigare, P. Leblanc, M. J. Mador, C. H. Cote, J. Jobin, and F. Maltais. 2003. Contractile leg fatigue after cycle exercise: a factor limiting exercise in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 168:425-430.
7. Gallagher, C. 1990. Exercise and chronic obstructive pulmonary disease. *Med Clinics N Am.* 74:619-641.
8. Baarends, E. M., A. M. Schols, R. Mostert, and E. F. Wouters. 1997. Peak exercise response in relation to tissue depletion in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 10:2807-2813.
9. Kobayashi, A., T. Yoneda, M. Yoshikawa, M. Ikuno, H. Takenaka, A. Fukuoka, N. Narita, and K. Nezu. 2000. The relation of fat-free mass to maximum exercise performance in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Lung.* 178:119-127.
10. Jones, N. L. and K. J. Killian. 1991. Limitation of exercise in chronic airway obstruction. In N. S. Cherniack, editor *Chronic obstructive Pulmonary diseases* Saunders, Philadelphia. p 196-206.
11. Decramer, M., L. E. Gosselink, T. Troosters, and M. Verschuere. 1997. Muscle weakness is related to utilization of health care resources in COPD patients. *Eur Respir J.* 10:417-423.
12. Schols, A. M. W. J. 1998. Weight loss is a reversible factor in the prognosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 157:1791-1797.
13. Marquis, K., R. Debigare, Y. Lacasse, P. Leblanc, J. Jobin, G. Carrier, and F. Maltais. 2002. Midthigh muscle cross-sectional area is a better predictor of mortality than body mass index in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 166:809-813.
14. Mador, M. J. 2002. Muscle mass, not body weight, predicts outcome in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 166:787-789.
15. Andreassen, H. and J. Vestbo. 2003. Chronic obstructive pulmonary disease as a systemic disease: an epidemiological perspective. *Eur Respir J Suppl.* 46:2s-4s.
16. Celli, B. R., C. G. Cote, J. M. Marin, C. Casanova, d. O. Montes, R. A. Mendez, P. Pinto, V. and H. J. Cabral. 2004. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 350:1005-1012.
17. Engelen, M. P. K. J., A. M. W. J. Schols, W. C. Baken, G. J. Wesseling, and E. F. M. Wouters. 1994. Nutritional depletion in relation to respiratory and peripheral skeletal muscle function in out-patients with COPD. *Eur Respir J.* 7:1793-1797.
18. Schols, A. M., P. B. Soeters, R. Mostert, R. J. Pluymers, and E. F. Wouters. 1995. Physiologic effects of nutritional support and anabolic steroids in patients with chronic obstructive pulmonary disease. A placebo-controlled randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 152:1268-1274.

19. Laaban, J.-P., B. Kouchakji, M.-F. Dore, E. Orvoen-Frija, P. David, and J. Rochemaure. 1993. Nutritional status of patients with chronic obstructive pulmonary disease and acute respiratory failure. *Chest*. 103:1362-1368.
20. Schols, A. M. W. J., P. B. Soeters, A. M. C. Dingemans, R. Mostert, P. J. Frantzen, and E. F. M. Wouters. 1993. Prevalence and characteristics of nutritional depletion in patients with stable COPD eligible for pulmonary rehabilitation. *Am Rev Respir Dis*. 147:1151-1156.
21. Eid, A. A., A. A. Ionescu, L. S. Nixon, V. Lewis-Jenkins, S. B. Matthews, T. L. Griffiths, and D. J. Shale. 2001. Inflammatory response and body composition in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 164:1414-1418.
22. Engelen, M. P. K. J., A. M. W. J. Schols, J. D. Does, and E. F. M. Wouters. 2000. Skeletal muscle weakness is associated with wasting of extremity fat-free mass but not with airflow obstruction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr*. 71:733-738.
23. Bernard, S., P. Leblanc, F. Whittom, G. Carrier, J. Jobin, R. Belleau, and F. Maltais. 1998. Peripheral Muscle Weakness in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 158:629-634.
24. Hamilton, A. L., K. J. Killian, E. Summers, and N. L. Jones. 1995. Muscle strength, symptom intensity, and exercise capacity in patients with cardiorespiratory disorders. *Am J Respir Crit Care Med*. 152:2021-2031.
25. Debigare, R., C. H. Cote, F. S. Hould, P. Leblanc, and F. Maltais. 2003. In vitro and in vivo contractile properties of the vastus lateralis muscle in males with COPD. *Eur Respir J*. 21:273-278.
26. Killian, K. J., E. Summers, N. L. Jones, and E. J. M. Campbell. 1992. Dyspnea and leg efforts during incremental cycle ergometry. *Am Rev Respir Dis*. 145:1339-1345.
27. Mador, M. J., T. J. Kufel, and L. A. Pineda. 2000. Quadriceps fatigue after cycle exercise in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 161:447-453.
28. Mador, M. J., E. Bozkanat, and T. J. Kufel. 2003. Quadriceps fatigue after cycle exercise in patients with COPD compared with healthy control subjects. *Chest*. 123:1104-1111.
29. Mador, M. J., O. Deniz, A. Aggarwal, and T. J. Kufel. 2003. Quadriceps fatigability after single muscle exercise in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 168:102-108.
30. Jeffery, M. M., T. J. Kufel, and L. A. Pineda. 2000. Quadriceps and diaphragmatic function after exhaustive cycle exercise in the healthy elderly. *Am J Respir Crit Care Med*. 162:1760-1766.
31. Mador, M. J., T. J. Kufel, L. A. Pineda, A. Steinwald, A. Aggarwal, A. M. Upadhyay, and M. A. Khan. 2001. Effect of pulmonary rehabilitation on quadriceps fatigability during exercise. *Am J Respir Crit Care Med*. 163:930-935.
32. Serres, I., V. Gautier, A. Varray, and C. Prefaut. 1998. Impaired skeletal muscle endurance related to physical inactivity and altered lung function in COPD patients. *Chest*. 113:900-905.
33. Newell, S. Z., D. K. McKenzie, and S. C. Gandevia. 1989. Inspiratory and skeletal muscle strength and endurance and diaphragmatic activation in patients with chronic airflow limitation. *Thorax*. 44:903-912.
34. Coronell, C., M. Orozco-Levi, R. Mendez, A. Ramirez-Sarmiento, J. B. Galdiz, and J. Gea. 2004. Relevance of assessing quadriceps endurance in patients with COPD. *Eur Respir J*. 24:129-136.
35. Metzger, J. M. and R. L. Moss. 1987. Greater hydrogen ion-induced depression of tension and velocity in skinned single fibres of rat fast than slow muscles. *J Physiol*. 393:727-742.
36. Cooke, R., K. Franks, G. B. Luciani, and E. Pate. 1988. The inhibition of rabbit skeletal muscle contraction by hydrogen ions and phosphate. *J Physiol*. 395:77-97.
37. Lamb, G. D. and D. G. Stephenson. 1991. Effect of Mg<sup>2+</sup> on the control of Ca<sup>2+</sup> release in skeletal muscle fibres of the toad. *J Physiol*. 434:507-528.
38. Reid, M. B. 2001. Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol*. 90:724-731.
39. Kosmas, E. N., S. A. Hussain, J. M. Montserrat, and R. D. Levy. 1996. Relationship of peak exercise capacity with indexes of peripheral muscle vasodilation. *Med Sci Sports Exerc*. 28:1254-1259.
40. Schiaffino, S. and G. Salviati. 1997. Molecular diversity of myofibrillar proteins: isoforms analysis at the protein and mRNA level. *Methods Cell Biol*. 52:349-369.
41. Gollnick, P. D., R. B. Armstrong, C. W. Saubert, K. Piehl, and B. Saltin. 1972. Enzyme activity and fiber composition in skeletal muscle of untrained and trained men. *J Appl Physiol*. 33:312-319.
42. Schiaffino, S. and C. Reggiani. 1996. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev*. 76:371-423.
43. Armstrong, R. B. 1988. Muscle fiber recruitment patterns and their metabolic correlates. In H. S. Horton and R. L. Terjung, editors *Exercise, nutrition, and energy metabolism* Macmillan Publishing Company, New York. p 9-26.

44. Harridge, S. D., R. Bottinelli, M. Canepari, M. A. Pellegrino, C. Reggiani, M. Esbjornsson, and B. Saltin. 1996. Whole-muscle and single-fibre contractile properties and myosin heavy chain isoforms in humans. *Pflugers Arch.* 432:913-920.
45. McComas, A. J. 1996. Skeletal muscle: forma and function. Champaign, IL: Human Kinetics.
46. Pereira Sant'Ana, J. A., S. Ennion, A. J. Sargeant, A. F. Moorman, and G. Goldspink. 1997. Comparison of the molecular, antigenic and ATPase determinants of fast myosin heavy chains in rat and human: a single-fibre study. *Pflugers Arch.* 435:151-163.
47. Ennion, S., P. J. Sant'ana, A. J. Sargeant, A. Young, and G. Goldspink. 1995. Characterization of human skeletal muscle fibres according to the myosin heavy chains they express. *J Muscle Res Cell Motil.* 16:35-43.
48. Smerdu, V., I. Karsch-Mizrachi, M. Campione, L. Leinwand, and S. Schiaffino. 1994. Type IIX myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle. *Am J Physiol.* 267:C1723-C1728.
49. Schiaffino, S., L. Gorza, S. Sartore, L. Saggini, S. Ausoni, M. Vianello, K. Gunderson, and T. Lomo. 1989. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil.* 10:197-205.
50. Biral, D., R. Betto, D. Danieli-Betto, and G. Salviati. 1988. Myosin heavy chain composition of single fibres from normal human muscle. *Biochem J.* 250:307-308.
51. Larsson, L. and R. L. Moss. 1993. Maximum velocity of shortening in relation to myosin isoform composition in single fibres from human skeletal muscles. *J Physiol.* 472:595-614.
52. Klitgaard, H., M. Zhou, S. Schiaffino, R. Betto, G. Salviati, and B. Saltin. 1990. Ageing alters the myosin heavy chain composition of single fibres from human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 140:55-62.
53. Andersen, J. L. and S. Schiaffino. 1997. Mismatch between myosin heavy chain mRNA and protein distribution in human skeletal muscle fibers. *Am J Physiol.* 272:C1881-C1889.
54. Haggmark, T., E. Eriksson, and E. Jansson. 1986. Muscle fiber type changes in human skeletal muscle after injuries and immobilization. *Orthopedics.* 9:181-185.
55. Larsson, L. and T. Ansved. 1985. Effects of long-term physical training and detraining on enzyme histochemical and functional skeletal muscle characteristic in man. *Muscle Nerve.* 8:714-722.
56. Howald, H., H. Hoppeler, H. Claassen, O. Mathieu, and R. Straub. 1985. Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans. *Pflugers Arch.* 403:369-376.
57. Hughes, R. L., H. Katz, V. Sahgal, J. A. Campbell, R. Hartz, and T. W. Shields. 1983. Fiber size and energy metabolites in five separate muscles from patients with chronic obstructive lung diseases. *Respiration.* 44:321-328.
58. Whittom, F., J. Jobin, P. M. Simard, P. Leblanc, C. Simard, S. Bernard, R. Belleau, and F. Maltais. 1998. Histochemical and morphological characteristics of the vastus lateralis muscle in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Med Sci Sports Exerc.* 30:1467-1474.
59. Maltais, F., M. J. Sullivan, P. Leblanc, B. D. Duscha, F. H. Schachat, C. Simard, J. M. Blank, and J. Jobin. 1999. Altered expression of myosin heavy chain in the vastus lateralis muscle in patients with COPD. *Eur Respir J.* 13:850-854.
60. Satta, A., G. B. Migliori, A. Spanevello, M. Neri, R. Bottinelli, M. Canepari, M. A. Pellegrino, and C. Reggiani. 1997. Fibre types in skeletal muscles of chronic obstructive pulmonary disease patients related to respiratory function and exercise tolerance. *Eur Respir J.* 10:2853-2860.
61. Jobin, J., F. Maltais, J. F. Doyon, P. Leblanc, P. M. Simard, and A. A. Simard. 1998. Chronic obstructive pulmonary disease: capillarity and fiber characteristics of skeletal muscle. *J Cardiopulm Rehabil.* 18:432-437.
62. Jakobsson, P., L. Jorfeldt, and A. Brundin. 1990. Skeletal muscle metabolites and fibre types in patients with advanced chronic obstructive pulmonary disease (COPD), with and without chronic respiratory failure. *Eur Respir J.* 3:192-196.
63. Hildebrand, I. L., C. Sylven, M. Esbjornsson, K. Hellstrom, and E. Jansson. 1991. Does chronic hypoxaemia induce transformations of fibre types? *Acta Physiol Scand.* 141:435-439.
64. Richardson, R. S., B. T. Leek, T. P. Gavin, L. J. Haseler, S. R. Mudaliar, R. Henry, O. Mathieu-Costello, and P. D. Wagner. 2004. Reduced mechanical efficiency in chronic obstructive pulmonary disease but normal peak VO<sub>2</sub> with small muscle mass exercise. *Am J Respir Crit Care Med.* 169:89-96.
65. Gosker, H. R., M. P. Engelen, H. van Mameren, P. J. van Dijk, G. J. Van der Vusse, E. F. Wouters, and A. M. Schols. 2002. Muscle fiber type IIX atrophy is involved in the loss of fat-free mass in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr.* 76:113-119.
66. Gosker, H. R., H. van Mameren, P. J. van Dijk, M. P. Engelen, G. J. Van der Vusse, E. F. Wouters, and A. M. Schols. 2002. Skeletal muscle fibre-type shifting and metabolic profile in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 19:617-625.
67. Booth, F. W. and P. D. Gollnick. 1983. Effects of disuse on the structure and function of skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc.* 15:415-420.

68. Itoh, K., T. Moritani, K. Ishida, C. Hirofujii, S. Taguchi, and M. Itoh. 1990. Hypoxia-induced fibre type transformation in rat hindlimb muscles. Histochemical and electro-mechanical changes. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 60:331-336.
69. Lindboe, C. F., F. Askevold, and M. Slettebo. 1982. Changes in skeletal muscles of young women with anorexia nervosa. An enzyme histochemical study. *Acta Neuropathol. (Berl)* 56:299-302.
70. Richardson, R. S., E. A. Noyszewski, K. F. Kendrick, J. S. Leigh, and P. D. Wagner. 1995. Myoglobin O<sub>2</sub> desaturation during exercise: Evidence of limited O<sub>2</sub> transport. *J Clin Invest.* 96:1916-1926.
71. Groebe, K. and G. Thews. 1990. Calculated intra- and extracellular PO<sub>2</sub> gradients in heavily working red muscle. *Am J Physiol.* 259:H84-H92.
72. Honig, C. R., T. E. Gayeski, W. Federspiel, A. Clark, Jr., and P. Clark. 1984. Muscle O<sub>2</sub> gradients from hemoglobin to cytochrome: new concepts, new complexities. *Adv Exp Med Biol.* 169:23-38.
73. Maltais, F., J. Jobin, M. J. Sullivan, S. Bernard, F. Whittom, K. J. Killian, M. Desmeules, P. Belanger, and P. Le Blanc. 1998. Lower limb metabolic and hemodynamic responses during exercise in normal subjects and in COPD. *J Appl Physiol.* 84:1573-1580.
74. Sala, E., J. Roca, R. M. Marrades, J. Alonso, J. M. Gonzalez de Suso, A. Moreno, J. Barbera, J. Nadal, Ll. Jover, R. Rodriguez-Roisin, and P. D. Wagner. 1999. Effects of endurance training on skeletal muscle bioenergetics in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 159:1726-1734.
75. Hare, J. M. 2004. Nitroso-redox balance in the cardiovascular system. *N Engl J Med.* 351:2112-2114.
76. Hare, J. M. 2003. Nitric oxide and excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol.* 35:719-729.
77. Simard, C., Maltais, F., Leblanc, P., Simard, P., and Jobin, J., 1996. Mitochondrial and Capillariry Changes in Vastus Lateralis Muscle of COPD Patients: Electron Microscopy Study. *Med.Sci.Sports Exerc.* 28[5], S95.
78. Fiaccadori, E., S. Del Canale, P. Vitali, E. Coffrini, N. Ronda, and A. Guariglia. 1987. Skeletal muscle energetics, acid-base equilibrium and lactate metabolism in patients with severe hypercapnia and hypoxemia. *Chest.* 92:883-887.
79. Casaburi, R., A. Patessio, F. Ioli, S. Zanaboni, C. F. Donner, and K. Wasserman. 1991. Reductions in exercise lactic acidosis and ventilation as a result of exercise training in patients with obstructive lung disease. *Am Rev Respir Dis.* 143:9-18.
80. Patessio, A., R. Casaburi, M. Carone, L. Appendini, C. F. Donner, and K. Wasserman. 1993. Comparison of gas exchange, lactate, and lactic acidosis thresholds in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am.Rev. Respir.Dis.* 148:622-626.
81. Engelen, M. P., R. Casaburi, R. Rucker, and E. Carithers. 1995. Contribution of the respiratory muscles to the lactic acidosis of heavy exercise in COPD. *Chest.* 108:1246-1251.
82. Maltais, F., P. Leblanc, F. Whittom, C. Simard, K. Marquis, M. Belanger, M. J. Breton, and J. Jobin. 2000. Oxidative enzyme activities of the vastus lateralis muscle and the functional status in patients with COPD. *Thorax.* 55:848-853.
83. Hunter, G. R., B. R. Newcomer, D. E. Larson-Meyer, M. M. Bamman, and R. L. Weinsier. 2001. Muscle metabolic economy is inversely related to exercise intensity and type II myofiber distribution. *Muscle Nerve.* 24:654-661.
84. Sauleda, J., F. García-Palmer, R. J. Wiesner, S. Tarraga, I. Harting, P. Tomás, C. Gómez, C. Saus, A. Palou, and A. G. N. Agustí. 1998. Cytochrome oxidase activity and mitochondrial gene expression in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 157:1413-1417.
85. Braun, S. R., N. L. Keim, R. M. Dixon, P. Clagnaz, A. Anderegg, and E. S. Shrago. 1984. The prevalence and determinants of nutritional changes in chronic obstructive pulmonary disease. *Chest.* 86:558-563.
86. Gray-Donald, K., L. Gibbons, S. H. Shapiro, and J. G. Martin. 1989. Effect of nutritional status on exercise performance in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis.* 140:1544-1548.
87. Kessler, R., M. Faller, G. Fourgaut, B. Mennecier, and E. Weintzenblum. 1999. Predictive factors of hospitalization for acute exacerbation in a series of 64 patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 159:158-164.
88. Wilson, D. O., R. M. Rogers, E. C. Wright, and N. R. Anthonisen. 1989. Body weight in chronic obstructive pulmonary disease. The National Institutes of Health Intermittent Positive-Pressure Breathing Trial. *Am Rev Respir Dis.* 139:1435-1438.
89. Connors, A. F., N. V. Dawson, C. Thomas, F. H. Harrel Jr, N. Desbiens, W. J. Fulkerson, P. Kussin, P. Bellamy, L. Goldman, and W. A. Knaus. 1996. Outcomes following acute exacerbation of severe chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 154:959-967.
90. Landbo, CH., E. Prescott, P. Lange, J. Vestbo, and T. P. Almdal. 1999. Prognostic Value of Nutritional Status in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 160:1856-1861.
91. Gray-Donald, K., L. Gibbons, S. H. Shapiro, P. T. Macklem, and J. G. Martin. 1996. Nutritional status and mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 153:961-966.

92. Schols, A. M., R. Mostert, P. B. Soeters, and E. F. Wouters. 1991. Body composition and exercise performance in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 46:695-699.
93. Mostert, R., A. Goris, C. Weling-Scheepers, E. F. Wouters, and A. M. Schols. 2000. Tissue depletion and health related quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 94:859-867.
94. Debigare, R., C. H. Cote, and F. Maltais. 2001. Peripheral Muscle Wasting in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Clinical relevance and mechanisms. *Am J Respir Crit Care Med*. 164:1712-1717.
95. ATS/ERS statement. 1999. "Skeletal Muscle Dysfunction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease". *Am J Respir Crit Care Med*. 159:S1-S40.
96. Agusti, A. G., A. Noguera, J. Sauleda, E. Sala, J. Pons, and X. Busquets. 2003. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 21:347-360.
97. Wouters, E. F., E. C. Creutzberg, and A. M. Schols. 2002. Systemic effects in COPD. *Chest*. 121:127S-130S.
98. Engelen, M. P. K. J., N. E. P. Deutz, E. F. M. Wouters, and A. M. W. J. Schols. 2000. Enhanced levels of whole-body protein turnover in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 162:1488-1492.
99. Morrison, W. L., J. Gibson, C. Scrimgeour, and M. J. Rennie. 1988. Muscle wasting in emphysema. *Clin Sci*. 75:415-420.
100. Aguilaniu, B., S. Goldstein-Shapses, A. Pajon, P. Levy, F. Sarrot, X. Lerverve, E. Page, and J. Askanazi. 1992. Muscle protein degradation in severely malnourished patients with chronic obstructive pulmonary disease subject to short-term total parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enter Nutr*. 16:248-254.
101. Jagoe, R. T. and A. L. Goldberg. 2001. What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 4:183-190.
102. Bossola, M., M. Muscaritoli, P. Costelli, R. Bellantone, F. Pacelli, S. Busquets, J. Argiles, F. J. Lopez-Soriano, I. M. Civello, F. M. Baccino, F. F. Rossi, and G. B. Doglietto. 2001. Increased muscle ubiquitin mRNA levels in gastric cancer patients. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 280:R1518-R1523.
103. Williams, A., X. Sun, J. E. Fischer, and P. O. Hasselgren. 1999. The expression of genes in the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway is increased in skeletal muscle from patients with cancer. *Surgery*. 126:744-749.
104. Fryburg, D. A. 1994. Insulin-like growth factor I exerts growth hormone- and insulin-like actions on human muscle protein metabolism. *Am J Physiol*. 267:E331-E336.
105. Fryburg, D. A. and E. J. Barrett. 1993. Growth hormone acutely stimulates skeletal muscle but not whole-body protein synthesis in humans. *Metabolism*. 42:1223-1227.
106. Creutzberg, E. C. and R. Casaburi. 2003. Endocrinological disturbances in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl*. 46:76s-80s.
107. Di Francia, M., D. Barbier, J. Mege, and J. Orehek. 1994. Tumor necrosis factor-alpha and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 150:1453-1455.
108. Jurasinski, C. V., L. Kilpatrick, and T. C. Vary. 1995. Amrinone prevents muscle protein wasting during chronic sepsis. *Am J Physiol*. 268:E491-E500.
109. Frost, R. A., C. H. Lang, and M. C. Gelato. 1997. Transient exposure of human myoblasts to tumor necrosis factor-alpha inhibits serum and insulin-like growth factor-I stimulated protein synthesis. *Endocrinology*. 138:4153-4159.
110. Kamischke, A., D. E. Kemper, M. A. Castel, M. Luthke, C. Rolf, H. M. Behre, H. Magnussen, and E. Nieschlag. 1998. Testosterone levels in men with chronic obstructive pulmonary disease with or without glucocorticoid therapy. *Eur Respir J*. 11:41-45.
111. Pape, G. S., M. Friedman, L. E. Underwood, and D. R. Clemmons. 1991. The effect of growth hormone on weight gain and pulmonary function in patients with chronic obstructive lung disease. *Chest*. 99:1495-1500.
112. Burdet, L., B. de Mural, Y. Schutz, C. Pichard, and J. W. Fitting. 1997. Administration of growth hormone to underweight patients with chronic obstructive pulmonary disease. A prospective, randomized, controlled study. *Am J Respir Crit Care Med*. 156:1800-1806.
113. Ferreira, I. M., I. T. Verreschi, L. E. Nery, R. S. Goldstein, N. Zamel, D. Brooks, and J. R. Jardim. 1998. The influence of 6 months of oral anabolic steroids on body mass and respiratory muscles in undernourished COPD patients. *Chest*. 114:19-28.
114. Creutzberg, E. C., E. F. Wouters, R. Mostert, R. J. Pluymer, and A. M. Schols. 2003. A role for anabolic steroids in the rehabilitation of patients with COPD? A double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Chest*. 124:1733-1742.
115. Yeh, S. S., B. DeGuzman, and T. Kramer. 2002. Reversal of COPD-associated weight loss using the anabolic agent oxandrolone. *Chest*. 122:421-428.
116. Engelen, M. P., E. F. Wouters, N. E. Deutz, J. D. Does, and A. M. Schols. 2001. Effects of exercise on amino acid metabolism in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 163:859-864.
117. Schols, A. M. and E. F. Wouters. 2000. Nutritional abnormalities and supplementation in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med*. 21:753-762.

118. Schols, A. M. W. J., P. B. Soeters, R. Mostert, W. H. M. Saris, and E. F. M. Wouters. 1991. Energy balance in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis.* 143:1248-1252.
119. Wilson, D. O., M. Donahoe, R. M. Rogers, and B. E. Pennock. 1990. Metabolic rate and weight loss in chronic obstructive lung disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 14:7-11.
120. Baarends, E. M., A. M. W. J. Schols, D. J. Slebos, R. Mostert, P. P. Janssen, and E. F. M. Wouters. 1995. Metabolic and ventilatory response pattern to arm elevation in patients with COPD and healthy age-matched subjects. *Eur Respir J.* 8:1345-1351.
121. Baarends, E. M., A. M. W. J. Schols, D. L. E. Pannemans, K. R. Westerterp, and E. F. M. Wouters. 1997. Total free living energy expenditure in patients with severe COPD. *Eur Respir J.* 15:549-554.
122. Hugli, O., Y. Schutz, and J. W. Fitting. 1996. The daily energy expenditure in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 153:294-300.
123. Baarends, E. M., A. M. Schols, M. A. Akkermans, and E. F. Wouters. 1997. Decreased mechanical efficiency in clinically stable patients with COPD. *Thorax.* 52:981-986.
124. Williams, T. J., R. E. O'Hehir, D. Czarny, M. Horne, and G. Bowes. 1988. Acute myopathy in severe acute asthma treated with intravenously administered corticosteroids. *Am Rev Respir Dis.* 137:460-463.
125. Shee, C. D. 1990. Risk factors for hydrocortisone myopathy in acute severe asthma. *Respir Med.* 84:229-233.
126. Decramer, M., V. De Bock, and R. Dom. 1996. Functional and histologic picture of steroid-induced myopathy in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 153:1958-1964.
127. Preedy, V. R., D. M. Smith, and P. H. Sugden. 1985. The effects of 6 hours of hypoxia on protein synthesis in rat tissues in vivo and in vitro. *Biochem.J* 228:179-185.
128. Green, H. J., J. R. Sutton, A. Cymerman, P. M. Young, and C. S. Houston. 1989. Operation Everest II: adaptations in human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 66:2454-2461.
129. Bigard, A. X., A. Brunet, C. Y. Guezennec, and H. Monod. 1991. Skeletal muscle changes after endurance training at high altitude. *J Appl Physiol.* 71:2114-2121.
130. Howald, H., D. Pette, J. A. Simoneau, A. Uber, H. Hoppeler, and P. Cerretelli. 1990. Effects of chronic hypoxia on muscle enzyme activities. *Int J Sports Med.* 11:S10-S14.
131. Kwast, K. E. and S. C. Hand. 1996. Acute depression of mitochondrial protein synthesis during anoxia: contributions of oxygen sensing, matrix acidification, and redox state. *J Biol Chem.* 271:7313-7319.
132. Bigard, A. X., H. Sanchez, O. Birot, and B. Serrurier. 2000. Myosin heavy chain composition of skeletal muscles in young rats growing under hypobaric hypoxia conditions. *J Appl Physiol.* 88:479-486.
133. Rennie, M. J., R. H. Edwards, P. W. Emery, D. Halliday, K. Lundholm, and D. J. Millward. 1983. Depressed protein synthesis is the dominant characteristic of muscle wasting and cachexia. *Clin Physiol.* 3:387-398.
134. Cechetto, D. and G. W. Mainwood. 1978. Carbon dioxide and acid base balance in the isolated rat diaphragm. *Pfluegers Arch.* 376:251-258.
135. Trivedi, B. and W. H. Danforth. 1966. Effect of pH on the kinetics of frog muscle phosphofructokinase. *J Biol Chem.* 241:4110-4112.
136. Gertz, I., G. Hedenstierna, G. Hellers, and J. Wahren. 1977. Muscle metabolism in patients with chronic obstructive lung disease and acute respiratory failure. *Clin Sci.* 52:395-403.
137. Sahlin, K., L. Edstrom, and H. Sjöholm. 1983. Fatigue and phosphocreatine depletion during carbon dioxide-induced acidosis in rat muscle. *Am J Physiol.* 245:C15-C20.
138. Mitch, W. E. 1998. Robert H Herman Memorial Award in Clinical Nutrition Lecture, 1997. Mechanisms causing loss of lean body mass in kidney disease. *Am J Clin Nutr.* 67:359-366.
139. Bailey, J. L., X. Wang, B. K. England, S. R. Price, X. Ding, and W. E. Mitch. 1996. The acidosis of chronic renal failure activates muscle proteolysis in rats by augmenting transcription of genes encoding proteins of the ATP-dependent ubiquitin-proteasome pathway. *J Clin Invest.* 97:1447-1453.
140. Reaich, D., S. M. Channon, C. M. Scrimgeour, S. E. Daley, R. Wilkinson, and T. H. Goodship. 1993. Correction of acidosis in humans with CRF decreases protein degradation and amino acid oxidation. *Am J Physiol.* 265:E230-E235.
141. Burnett, D., A. Chamba, S. L. Hill, and R. A. Stockley. 1987. Neutrophils from subjects with chronic obstructive lung disease show enhanced chemotaxis and extracellular proteolysis. *Lancet.* 2:1043-1046.
142. Noguera, A., S. Batle, C. Miralles, J. Iglesias, X. Busquets, W. MacNee, and A. G. Agusti. 2001. Enhanced neutrophil response in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 56:432-437.
143. Noguera, A., X. Busquets, J. Saulea, J. M. Villaverde, W. MacNee, and A. G. Agusti. 1998. Expression of adhesion molecules and G proteins in circulating neutrophils in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 158:1664-1668.
144. Schols, A. M. W. J., W. A. Buurman, and D. M. W. E. Staal van den Brekel AJ. 1996. Evidence for a relation between



- metabolic derangements and increased levels of inflammatory mediators in a subgroup of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 51:819-824.
145. Yasuda, N., K. Gotoh, S. Minatoguchi, K. Asano, K. Nishigaki, M. Nomura, A. Ohno, M. Watanabe, H. Sano, H. Kumada, T. Sawa, and H. Fujiwara. 1998. An increase of soluble Fas, an inhibitor of apoptosis, associated with progression of COPD. *Respir Med*. 92:993-999.
  146. Malo, O., J. Sauleda, X. Busquets, C. Miralles, A. G. Agusti, and A. Noguera. 2002. [Systemic inflammation during exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease]. *Arch Bronconeumol*. 38:172-176.
  147. de Godoy, I., M. Donahoe, W. J. Calhoun, J. Mancino, and R. M. Rogers. 1996. Elevated TNF- $\alpha$  production by peripheral blood monocytes of weight-losing COPD patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 153:633-637.
  148. Li, Y. P., R. J. Schwartz, I. A. Waddell, B. R. Holloway, and M. B. Reid. 1998. Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF- $\kappa$ B activation in response to TNF- $\alpha$ . *FASEB J*. 12:871-880.
  149. Langen, R. C., A. M. Schols, M. C. Kelders, E. F. Wouters, and Y. M. Janssen-Heininger. 2001. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor- $\kappa$ B. *FASEB J*. 15:1169-1180.
  150. Petrache, I., L. E. Otterbein, J. Alam, G. W. Wiegand, and A. M. Choi. 2000. Heme oxygenase-1 inhibits TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in cultured fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 278:L312-L319.
  151. Carbo, N., S. Busquets, M. van Royen, B. Alvarez, F. J. Lopez-Soriano, and J. M. Argiles. 2002. TNF- $\alpha$  is involved in activating DNA fragmentation in skeletal muscle. *Br J Cancer*. 86:1012-1016.
  152. Agusti, A. G., J. Sauleda, C. Miralles, C. Gomez, B. Togores, E. Sala, S. Batle, and X. Busquets. 2002. Skeletal muscle apoptosis and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 166:485-489.
  153. Orozco-Levi, M. 2003. Structure and function of the respiratory muscles in patients with COPD: impairment or adaptation? *Eur Respir J Suppl*. 46:41s-51s.
  154. Orozco-Levi, M., J. Gea, J. L. Lloreta, M. Felez, J. Minguella, S. Serrano, and J. M. Broquetas. 1999. Subcellular adaptation of the human diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 13:371-378.
  155. Lloreta, J., M. Orozco, J. Gea, J. M. Corominas, and S. Serrano. 1996. Selective diaphragmatic mitochondrial abnormalities in a patient with marked air flow obstruction. *Ultrastruct Pathol*. 20:67-71.
  156. Levine, S., L. Kaiser, J. Leferovich, and B. Tikunov. 1997. Cellular adaptations in the diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 337:1799-1806.
  157. Levine, S., C. Gregory, T. Nguyen, J. Shrager, L. Kaiser, N. Rubinstein, and G. Dudley. 2002. Bioenergetic adaptation of individual human diaphragmatic myofibers to severe COPD. *J Appl Physiol*. 92:1205-1213.
  158. Roca, J., Weisman, I. M., Palange, P., and Whipp, B., Roca, J. and Whipp, B. 1997. Clinical Exercise Testing. *European Respiratory Monograph* [Chapter 5], 88-114.
  159. Jaspers, S. R. and M. E. Tischler. 1984. Atrophy and growth failure of rat hindlimb muscles in tail-cast suspension. *J Appl Physiol*. 57:1472-1479.
  160. Ferrando, A. A., H. W. Lane, C. A. Stuart, J. Davis-Street, and R. R. Wolfe. 1996. Prolonged bed rest decreases skeletal muscle and whole body protein synthesis. *Am J Physiol*. 270: E627-E633.
  161. Gibson, J. N., D. Halliday, W. L. Morrison, P. J. Stoward, G. A. Hornsby, P. W. Watt, G. Murdoch, and A. J. Rennie. 1987. Decrease in human quadriceps muscle protein turnover consequent upon leg immobilization. *Clin Sci (Lond)*. 72:503-509.
  162. Adams, G. R., B. M. Hather, and G. A. Dudley. 1994. Effect of short-term unweighting on human skeletal muscle strength and size. *Aviat Space Environ Med*. 65:1116-1121.
  163. Taillandier, D., E. Auroousseau, D. Meynial-Denis, D. Bechet, M. Ferrara, P. Cottin, A. Ducastaing, X. Bigard, C. Y. Guezennec, H. P. Schmid, and . 1996. Coordinate activation of lysosomal, Ca<sup>2+</sup>-activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. *Biochem J*. 316 ( Pt 1):65-72.
  164. Bodine, S. C., E. Latres, S. Baumhueter, V. K. Lai, L. Nunez, B. A. Clarke, W. T. Poueymirou, F. J. Panaro, E. Na, K. Dharmarajan, Z. Q. Pan, D. M. Valenzuela, T. M. DeChiara, T. N. Stitt, G. D. Yancopoulos, and D. J. Glass. 2001. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 294:1704-1708.
  165. Jones, S. W., R. J. Hill, P. A. Krasney, B. O'Conner, N. Peirce, and P. L. Greenhaff. 2004. Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *FASEB J*. 18:1025-1027.
  166. Maltais, F., P. Leblanc, C. Simard, J. Jobin, C. Bérubé, J. Bruneau, L. Carrier, and R. Belleau. 1996. Skeletal muscle adaptation to endurance training in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 154:442-447.
  167. Maltais, F., P. Leblanc, J. Jobin, C. Berube, J. Bruneau, L. Carrier, M. J. Breton, G. Falardeau, and R. Belleau. 1997. Intensity of training and physiologic adaptation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 155:555-561.

168. Franssen, F. M., R. Broekhuizen, P. P. Janssen, E. F. Wouters, and A. M. Schols. 2004. Effects of Whole-Body Exercise Training on Body Composition and Functional Capacity in Normal-Weight Patients With COPD. *Chest*. 125:2021-2028.
169. Belman, M. J. 1986. Exercise in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med*. 7:585-597.
170. Barbera, J. A., G. Peces-Barba, A. G. Agusti, J. L. Izquierdo, E. Monso, T. Montemayor, and J. L. Viejo. 2001. [Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of chronic obstructive pulmonary disease]. *Arch Bronconeumol*. 37:297-316.
171. Ries, A. L., B. W. Carlin, V. Carrieri-Kohlman, and et al. 1997. Pulmonary rehabilitation: joint ACCP/AACVPR evidence-based guidelines. ACCP/AACVPR Pulmonary Rehabilitation Guidelines Panel. American College of Chest Physicians. American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation. *Chest*. 112:1363-1396.
172. Lacasse, Y., E. Wong, G. H. Guyatt, D. King, D. J. Cook, and R. S. Goldstein. 1996. Meta-analysis of respiratory rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 348:1115-1119.
173. Sauleda, J., F. J. Garcia-Palmer, G. Gonzalez, A. Palou, and A. G. Agusti. 2000. The activity of cytochrome oxidase is increased in circulating lymphocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and chronic arthritis. *Am J Respir Crit Care Med*. 161:32-35.
174. Hather, B. M., G. R. Adams, P. A. Tesch, and G. A. Dudley. 1992. Skeletal muscle responses to lower limb suspension in humans. *J Appl Physiol*. 72:1493-1498.
175. Repine, J. E., A. Bast, and I. Lankhorst. 1997. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. *Am J Respir Crit Care Med*. 156:341-357.
176. Nowak, D., A. Antczak, M. Krol, T. Pietras, B. Shariati, P. Bialasiewicz, K. Jeczowski, and P. Kula. 1996. Increased content of hydrogen peroxide in the expired breath of cigarette smokers. *Eur Respir J*. 9:652-657.
177. MacNee, W. and I. Rahman. 1999. Oxidants and antioxidants as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 160:S58-S65.
178. Dekhuijzen, P. N., K. K. Aben, I. Dekker, L. P. Aarts, P. L. Wielders, C. L. van Herwaarden, and A. Bast. 1996. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 154:813-816.
179. Thompson, A. B., T. Bohling, A. Heires, J. Linder, and S. I. Rennard. 1991. Lower respiratory tract iron burden is increased in association with cigarette smoking. *J Lab Clin Med*. 117:493-499.
180. Pinamonti, S., M. Muzzoli, M. C. Chicca, A. Papi, F. Ravenna, L. M. Fabbri, and A. Ciaccia. 1996. Xanthine oxidase activity in bronchoalveolar lavage fluid from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Free Radic Biol Med*. 21:147-155.
181. Heunks, L. M., J. Viña, C. L. van Herwaarden, H. T. Folgering, A. Gimeno, and P. N. Dekhuijzen. 1999. Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol*. 277:R1697-R1704.
182. Rahman, I., D. Morrison, K. Donaldson, and W. Mac Nee. 1996. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 154:1055-1060.
183. Morrow, J. D., B. Frei, W. A. Longmire, M. Gaziano, S. M. Lynch, Y. Shyr, W. E. Strauss, J. A. Oates, and L. J. I. Roberts. 1995. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F<sub>2</sub>-isoprostanes) in smokers. *N Engl J Med*. 332:1198-1203.
184. Celermajer, D. S. 1996. Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. *New Engl J Med*. 334:150-154.
185. Raitakari, O. T., M. R. Adams, R. J. McCredie, K. A. Griffiths, and D. S. Celermajer. 1999. Arterial endothelial dysfunction related to passive smoking is potentially reversible in healthy young adults. *Ann Intern Med*. 130:578-581.
186. Cucina, A., P. Sapienza, V. Corvino, V. Borrelli, V. Mariani, B. Randone, D. L. Santoro, and A. Cavallaro. 2000. Nicotine-induced smooth muscle cell proliferation is mediated through bFGF and TGF-beta 1. *Surgery*. 127:316-322.
187. Broal, P. 1992. Main features of structure and function. In P. Broal, editor *The central nervous system* Oxford University Press, New York. p 5-50.
188. Pratico, D., S. Basili, M. Vieri, C. Cordova, F. Violi, and G. A. Fitzgerald. 1998. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with an increase in urinary levels of isoprostane F<sub>2</sub>alpha-III, an index of oxidant stress. *Am J Respir Crit Care Med*. 158:1709-1714.
189. Viña, J., E. Servera, M. Asensi, J. Sastre, F. V. Pallardó, J. A. Ferrero, J. G. d. I. Asunción, V. Antón, and J. Marín. 1996. Exercise causes blood glutathione oxidation in chronic obstructive pulmonary disease: prevention of O<sub>2</sub> therapy. *J Appl Physiol*. 81:2199-2202.
190. Reid, M. B. 2001. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle. Invited review: Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol*. 90:724-731.
191. Mitch, W. E. and A. L. Goldberg. 1996. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *N Engl J Med*. 335:1897-1905.



192. Buck, M. and M. Chojkier. 1996. Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in a murine model of cachexia is prevented by inhibitors of nitric oxide synthesis and antioxidants. *EMBO J.* 15:1753-1765.
193. Stadtman, E. R. 1990. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med.* 9:315-325.
194. Barreiro, E., J. Gea, J. M. Corominas, and S. N. Hussain. 2003. Nitric oxide synthases and protein oxidation in the quadriceps femoris of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 29:771-778.
195. Kobzik, L., M. B. Reid, D. S. Bredt, and J. S. Stamler. 1994. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature.* 372:546-548.
196. Williams, G., T. Brown, L. Becker, M. Prager, and B. P. Giroir. 1994. Cytokine-induced expression of nitric oxide synthase in C2C12 skeletal muscle myocytes. *Am J Physiol* 267:R1020-R1025.
197. Agusti, A., M. Morla, J. Sauleda, C. Saus, and X. Busquets. 2004. NF-kappaB activation and iNOS upregulation in skeletal muscle of patients with COPD and low body weight. *Thorax.* 59:483-487.
198. Brune, B., A. von Knethen, and K. B. Sandau. 1998. Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol.* 351:261-272.
199. Lanone, S., A. Mebazaa, C. Heymes, D. Henin, J. J. Poderoso, Y. Panis, C. Zedda, T. Billiari, D. Payen, M. Aubier, and J. Boczkowski. 2000. Muscular contractile failure in septic patients: role of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Am J Respir Crit Care Med.* 162:2308-2315.
200. Boveris, A., N. Oshino, and B. Chance. 1972. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 128:617-630.
201. Turrens, J. F., A. Alexandre, and A. L. Lehninger. 1985. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 237:408-414.
202. Fernandez Checa, J. C., N. Kaplowitz, C. García Ruiz, M. Miranda, M. Mari, E. Ardite, and A. Morales. 1997. GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am J Physiol.* 273:G7-G17.
203. Chance B., Sies H and Boveris A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527-605.
204. Miwa, S. and M. D. Brand. 2003. Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling. *Biochem Soc Trans.* 31:1300-1301.
205. Abate C., Patel FJ, RAUScher III FJ, and Curran T. 1990. Redox regulation of Fos and Jun DNA binding activity in vitro. *Science* 249:1157-1161.
206. Guyton, K. Z., Y. Liu, M. Gorospe, Q. Xu, and N. J. Holbrook. 1996. Activation of mitogen-activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem.* 271:4138-4142.
207. Flohe, L., R. Brigelius-Flohe, C. Saliou, M. G. Traber, and L. Packer. 1997. Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Radic Biol Med.* 22:1115-1126.
208. Chandel, N. S. and P. T. Schumacker. 2000. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J Appl Physiol.* 88:1880-1889.
209. Duranteau, J., N. S. Chandel, and P. T. Schumacker. 1998. Intracellular signaling by Reactive Oxygen Species during Hypoxia. *J Biol Chem.* 273:11619-11624.
210. Martenson J., Lai CK and Meister A. 1990. High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:7185-7189.
211. Garcia-Ruiz, C., A. Colell, A. Morales, N. Kaplowitz, and J. C. Fernandez-Checa. 1995. Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor-kappa B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Mol Pharmacol.* 48:825-834.
212. Jammes, Y., J. G. Steinberg, F. Bregeon, and S. Delliaux. 2004. The oxidative stress in response to routine incremental cycling exercise in healthy sedentary subjects. *Respir Physiol Neurobiol.* 144:81-90.
213. Sastre, J., M. Asensi, E. Gascó, F. V. Pallardó, J. A. Ferrero, T. Furukawa, and J. Viña. 1992. Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol.* 263:R992-R995.
214. Engelen, M. P. K. J., A. M. W. J. Schols, J. D. Does, N. E. P. Deutz, and E. F. Wouters. 2000. Altered glutamate metabolism is associated with reduced muscle glutathione levels in patients with emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 161:98-103.
215. Engelen, M. P., A. M. Schols, J. D. Does, H. R. Gosker, N. E. Deutz, and E. F. Wouters. 2000. Exercise-induced lactate increase in relation to muscle substrates in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 162:1697-1704.
216. Koechlin, C., A. Couillard, D. Simar, J. P. Cristol, H. Bellet, M. Hayot, and C. Prefaut. 2004. Does oxidative stress alter quadriceps endurance in chronic obstructive pulmonary disease? *Am J Respir Crit Care Med.* 169:1022-1027.
217. Couillard, A., C. Koechlin, J. P. Cristol, A. Varray, and C. Prefaut. 2002. Evidence of local exercise-induced systemic oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Eur Respir J.* 20:1123-1129.

218. Couillard, A., F. Maltais, D. Saey, R. Debigare, A. Michaud, C. Koechlin, P. Leblanc, and C. Prefaut. 2003. Exercise-induced quadriceps oxidative stress and peripheral muscle dysfunction in COPD patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 167:1664-1669.
219. Beutler, B. and A. Cerami. 1987. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N Engl J Med.* 316:379-385.
220. Espat, N. J., E. M. Copeland, and L. L. Moldawer. 1994. Tumor necrosis factor and cachexia: a current perspective. *Surg Oncol.* 3:255-262.
221. Takabatake, M., H. Nakamura, S. Abe, T. Hino, H. Saito, H. Yuki, S. Kato, and H. Tomoike. 1999. Circulating leptin in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 159:1215-1219.
222. Greiwe, J. S., B. Cheng, D. C. Rubin, K. E. Yarasheski, and C. F. Semenkovich. 2001. Resistance exercise decreases skeletal muscle tumor necrosis factor  $\alpha$  in frail elderly humans. *FASEB J* 15:475-482.
223. Drenth, J. P., S. H. Van Uum, M. Van Deuren, G. J. Pesman, d. Van, V, and J. W. Van der Meer. 1995. Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but downregulates ex vivo TNF-alpha and IL-1 beta production. *J Appl Physiol.* 79:1497-1503.
224. Ostrowski, K., P. Schjerling, and B. K. Pedersen. 2000. Physical activity and plasma interleukin-6 in humans--effect of intensity of exercise. *Eur J Appl Physiol.* 83:512-515.
225. Nara, M., T. Kanda, S. Tsukui, T. Inukai, Y. Shimomura, S. Inoue, and I. Kobayashi. 1999. Running exercise increases tumor necrosis factor-alpha secreting from mesenteric fat in insulin-resistant rats. *Life Sci.* 65:237-244.
226. Rhind, S. G., J. W. Castellani, I. K. Brenner, R. J. Shephard, J. Zamecnik, S. J. Montain, A. J. Young, and P. N. Shek. 2001. Intracellular monocyte and serum cytokine expression is modulated by exhausting exercise and cold exposure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 281:R66-R75.
227. Albarenque, S. M., K. Suzuki, H. Nakayama, and K. Doi. 2001. Kinetics of cytokines mRNAs expression in the dorsal skin of WBN/ILA-Ht rats following topical application of T-2 toxin. *Exp Toxicol Pathol.* 53:271-274.
228. Yoshida, Y., M. Maruyama, T. Fujita, N. Arai, R. Hayashi, J. Araya, S. Matsui, N. Yamashita, E. Sugiyama, and M. Kobayashi. 1999. Reactive oxygen intermediates stimulate interleukin-6 production in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol.* 276:L900-L908.
229. Li, Y. P. and M. B. Reid. 2001. Effect of tumor necrosis factor-alpha on skeletal muscle metabolism. *Curr Opin Rheumatol.* 13:483-487.
230. Li, Y. P. and R. J. Schwartz. 2001. TNF-alpha regulates early differentiation of C2C12 myoblasts in an autocrine fashion. *FASEB J* 15:1413-1415.
231. Schutze, S., T. Machleidt, and M. Kronke. 1992. Mechanisms of tumor necrosis factor action. *Semin Oncol.* 19:16-24.
232. Shindoh, C., W. Hida, Y. Ohkawara, K. Yamauchi, I. Ohno, T. Takishima, and K. Shirato. 1995. TNF-alpha mRNA expression in diaphragm muscle after endotoxin administration. *Am J Respir Crit Care Med.* 152:1690-1696.
233. Saghizadeh, M., J. M. Ong, W. T. Garvey, R. R. Henry, and P. A. Kern. 1996. The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J Clin Invest.* 97:1111-1116.
234. Tartaglia, L. A. and D. V. Goeddel. 1992. Two TNF receptors. *Immunol. Today* 13:151-153.
235. Llovera, M., C. Garcia-Martinez, J. Lopez-Soriano, N. Carbo, N. Agell, F. J. Lopez-Soriano, and J. M. Argiles. 1998. Role of TNF receptor 1 in protein turnover during cancer cachexia using gene knockout mice. *Mol Cell Endocrinol.* 142:183-189.
236. Llovera, M., C. Garcia-Martinez, J. Lopez-Soriano, N. Agell, F. J. Lopez-Soriano, I. Garcia, and J. M. Argiles. 1998. Protein turnover in skeletal muscle of tumour-bearing transgenic mice overexpressing the soluble TNF receptor-1. *Cancer Lett.* 130:19-27.
237. Liu, Z. G., H. Hsu, D. V. Goeddel, and M. Karin. 1996. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell.* 87:565-576.
238. Sen, C. K., S. Khanna, A. Z. Reznick, S. Roy, and L. Packer. 1997. Glutathione regulation of tumor necrosis factor-alpha-induced NF-kappa B activation in skeletal muscle-derived L6 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 237:645-649.
239. Li, Y. P., C. M. Atkins, J. D. Sweatt, and M. B. Reid. 1999. Mitochondria mediate tumor necrosis factor-alpha/NF-kappaB signaling in skeletal muscle myotubes. *Antioxid Redox Signal.* 1:97-104.
240. Li, X., M. R. Moody, D. Engel, S. Walker, F. J. Clubb, Jr., N. Sivasubramanian, D. L. Mann, and M. B. Reid. 2000. Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha causes oxidative stress and contractile dysfunction in mouse diaphragm. *Circulation.* 102:1690-1696.
241. Wilcox, P. G., Y. Wakai, K. R. Walley, D. J. Cooper, and J. Road. 1994. Tumor necrosis factor alpha decreases in vivo diaphragm contractility in dogs. *Am J Respir Crit Care Med.* 150:1368-1373.
242. Wilcox, P., C. Milliken, and B. Bressler. 1996. High-dose tumor necrosis factor alpha produces an impairment of hamster diaphragm contractility. Attenuation with a prostaglandin inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med.* 153:1611-1615.

243. Alloatti, G., C. Penna, F. Mariano, and G. Camussi. 2000. Role of NO and PAF in the impairment of skeletal muscle contractility induced by TNF-alpha. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 279:R2156-R2163.
244. Diaz, P. T., M. W. Julian, M. D. Wewers, and T. L. Clanton. 1993. Tumor necrosis factor and endotoxin do not directly affect *in vitro* diaphragm function. *Am Rev Respir Dis* 148:281-287.
245. Tessitore, L., P. Costelli, and F. M. Baccino. 1993. Humoral mediation for cachexia in tumour-bearing rats. *Br J Cancer*. 67:15-23.
246. Lawson, D. H., A. Richmond, D. W. Nixon, and D. Rudman. 1982. Metabolic approaches to cancer cachexia. *Annu Rev Nutr*. 2:277-301.
247. Mealy, K., J. J. van Lanschot, B. G. Robinson, J. Rounds, and D. W. Wilmore. 1990. Are the catabolic effects of tumor necrosis factor mediated by glucocorticoids? *Arch Surg*. 125:42-47.
248. Guttridge, D. C., M. W. Mayo, L. V. Madrid, C. Y. Wang, and A. S. Baldwin, Jr. 2000. NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science*. 289:2363-2366.
249. Ladner, K. J., M. A. Caligiuri, and D. C. Guttridge. 2003. Tumor necrosis factor-regulated biphasic activation of NF-kappa B is required for cytokine-induced loss of skeletal muscle gene products. *J Biol Chem*. 278:2294-2303.
250. Li, Y. P. and M. B. Reid. 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-R1170.
251. Karin, M. and Y. Ben Neria. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol*. 18:621-663.
252. Ardite, E., J. A. Barbera, J. Roca, and J. C. Fernandez-Checa. 2004. Glutathione depletion impairs myogenic differentiation of murine skeletal muscle C2C12 cells through sustained NF-kappaB activation. *Am J Pathol*. 165:719-728.
253. Chandel, N. S., W. X. Trzyna, D. S. McClintock, and P. T. Schumacker. 2000. Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol*. 165:1013-1021.
254. Garcia-Martinez, C., N. Agell, M. Llovera, F. J. Lopez-Soriano, and J. M. Argiles. 1993. Tumour necrosis factor-alpha increases the ubiquitination of rat skeletal muscle proteins. *FEBS Lett*. 323:211-214.
255. Garcia-Martinez, C., M. Llovera, N. Agell, F. J. Lopez-Soriano, and J. M. Argiles. 1995. Ubiquitin gene expression in skeletal muscle is increased during sepsis: involvement of TNF-alpha but not IL-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 217:839-844.
256. Li, Y. P., S. H. Lecker, Y. Chen, I. D. Waddell, A. L. Goldberg, and M. B. Reid. 2003. TNF-alpha increases ubiquitin-conjugating activity in skeletal muscle by up-regulating UbcH2/E220k. *FASEB J*. 17:1048-1057.
257. Sabourin, L. A. and M. A. Rudnicki. 2000. The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet*. 57:16-25.
258. Davis, R. L., H. Weintraub, and A. B. Lassar. 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*. 51:987-1000.
259. Braun, T., G. Buschhausen-Denker, E. Bober, E. Tannich, and H. H. Arnold. 1989. A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J*. 8:701-709.
260. Edmondson, D. G. and E. N. Olson. 1989. A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev*. 3:628-640.
261. Braun, T., E. Bober, B. Winter, N. Rosenthal, and H. H. Arnold. 1990. Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: evidence for a gene cluster on chromosome 12. *EMBO J*. 9:821-831.
262. Guttridge, D. C., C. Albanese, J. Y. Reuther, R. G. Pestell, and A. S. Baldwin, Jr. 1999. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol*. 19:5785-5799.
263. Conejo, R., A. M. Valverde, M. Benito, and M. Lorenzo. 2001. Insulin produces myogenesis in C2C12 myoblasts by induction of NF-kappaB and downregulation of AP-1 activities. *J Cell Physiol*. 186:82-94.
264. Langen, R. C., J. L. Van Der Velden, A. M. Schols, M. C. Kelders, E. F. Wouters, and Y. M. Janssen-Heininger. 2004. Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization. *FASEB J*. 18:227-237.
265. Argiles, J. M. and F. J. Lopez-Soriano. 1999. The role of cytokines in cancer cachexia. *Med Res Rev*. 19:223-248.
266. Vatassery, G. T., K. S. SantaCruz, E. G. DeMaster, H. T. Quach, and W. E. Smith. 2004. Oxidative stress and inhibition of oxidative phosphorylation induced by peroxynitrite and nitrite in rat brain subcellular fractions. *Neurochem Int*. 45:963-970.



# Acrónimos

ACR = acceptor control ratio	iNOS = sintetasa inducible del óxido nítrico
ADN = ácido desoxirribonucleico	MDA = malondialdehido
ADNc = ácido desoxirribonucleico complementario	MgATP = ATPasa dependiente de magnesio
ADP = adenosin difosfato	MHC = cadena pesada de miosina
ARNm = ácido ribonucleico mensajero	MRF4 = factor regulador de la miogénesis-4
ATP = adenosin trifosfato	MyoD = factor de determinación miogénico
BMI = índice de masa corporal	Myf5 = factor miogénico-5
BMI <sub>L</sub> = índice de masa corporal bajo	NAD = nicotinamida-adenín-dinucleótido
BMI <sub>N</sub> = índice de masa corporal normal	NADH = nicotinamida-adenín-dinucleótido reducido
Ca <sup>++</sup> = calcio iónico	NAC = n-acetil-cisteína
CSA = cross sectional area	NFkB = factor de transcripción nuclear kappa B.
CO <sub>2</sub> = dióxido de carbono	NOS = sintetasa del óxido nítrico
EPOC = enfermedad pulmonar obstructiva crónica	O <sub>2</sub> = oxígeno molecular
FAD = flavin-adenin-dinucleótido	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> = anión superóxido
Fe = hierro	·OH = radical hidroxilo
FEV <sub>1</sub> = volumen espirado en el primer segundo	OMS = organización mundial de la salud
FFM = masa libre de grasa	ONNO = peróxinitrito
FM = masa grasa	<sup>31</sup> P = fósforo-31
GH = hormona de crecimiento	PaO <sub>2</sub> = presión parcial de oxígeno arterial
γGCS = gamma-glutamylcisteina sintetasa	PCr = fosfocreatina
γGCS-ARNm = ARN mensajero de la gamma-glutamylcisteina sintetasa	Pi = fósforo inorgánico
GPX = glutathion peroxidasa	PKC = protein-kinasa C
GR = glutathion reductasa	PO <sub>2</sub> = presión parcial de oxígeno
GSH = glutathion reducido	QO <sub>2</sub> = flujo de oxígeno
GSSG = glutathion oxidado	ROS = especies reactivas de oxígeno
H <sup>+</sup> = protón	RNS = especies reactivas de nitrógeno
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> = peróxido de hidrógeno	SOD = superóxido dismutasa
HGF = factor de crecimiento hepatocitario	TBARs = sustancias reactivas tiobarbitúricas
ID-1 = proteína inhibidora de la diferenciación-1	TNFα = factor de necrosis tumoral alpha
ID-3 = proteína inhibidora de la diferenciación-3	TNFR1 = receptor hidrosoluble del TNF-1
IFγ = interferón gamma	TNFR2 = receptor hidrosoluble del TNF-2
IGF-1 = factor de crecimiento simil insulina	UCP-3 = proteína desacopladora-3
IL-1 = interleucina-1	VEGF = factor de crecimiento del endotelio vascular
IL-6 = interleucina-6	VO <sub>2</sub> = consumo de oxígeno
IL-8 = interleucina-8	XO = xantino oxidasa



## EDITORIAL

**Editorials**

---

**COPD as a Muscle Disease**

Artists have much to teach us about respiratory pathophysiology. In his classic depiction of advanced emphysema (1), Dr. Frank Netter provides distinct cues that breathing is labored. The gentleman's lips are pursed and he sits with his shoulder girdle braced. However, the most striking physical sign is an asthenic phenotype, with obvious weight loss and marked atrophy of the trunk and limb muscles. This image clearly illustrates the muscle loss that commonly occurs in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and results in muscle dysfunction (2).

The mechanisms responsible for muscle dysfunction in COPD include the chronic effects of inflammatory mediators (2). In particular, skeletal muscle is exposed to increased concentrations of reactive oxygen species (ROS) that can inhibit force production, contribute to premature muscle fatigue, and promote muscle atrophy. Such responses require that ROS concentrations exceed the buffering capacity of antioxidants in skeletal muscle. The most important antioxidant is glutathione (GSH), a low-molecular-weight molecule present in muscle at millimolar concentrations. GSH inactivates ROS and other biologic oxidants, forming glutathione

disulfide (GSSG) as the oxidation by-product. GSSG is then recycled enzymatically to GSH. This cycle is dynamic; GSH is continually being oxidized to GSSG and resynthesized within mammalian cells. The GSH/GSSG cycle plays a fundamental role in cellular homeostasis. Indeed, the balance between GSH and GSSG can be used to assess overall redox environment of the cell (3).

In the current issue (pp. 1114–1118), Rabinovich and associates (4) provide new evidence that GSH regulation is abnormal in muscles of patients with COPD. These investigators tested the postulate that GSH buffering capacity could be enhanced in the lower limb muscles by exercise training. The 8-wk protocol of high-intensity training had the expected effect in control subjects. Compared with the untrained state, the trained vastus lateralis muscle maintained GSH at significantly higher levels after a bout of exhaustive exercise. Thus, training appeared to increase the efficacy of antioxidant buffering in control subjects as expected (5). No such benefit was seen in individuals with COPD. GSH concentrations measured after exhaustive exercise were unaltered by training. Worse, training increased the GSSG levels measured after exhaustive exercise.

The latter finding is paradoxical. Accumulation of the oxidized GSSG molecule suggests that training can be disadvantageous in patients with COPD, making the muscles more susceptible to exercise-induced oxidative stress. How might this be? Where did the system go wrong? The data of Rabinovich and associates provide us with several clues: First, before exercise, GSH and GSSG concentrations in the muscles of trained patients with COPD were not different from the values obtained in trained control subjects. This argues that training did not induce GSH depletion. Nor does it appear that oxidative stress in the lungs or other remote organs starved the muscle of circulating substrate for GSH synthesis. Second, the loss of GSH/GSSG regulation was closely correlated with the gain in exercise capacity produced by training. The strenuous contraction required for skeletal muscle training causes the muscles to generate oxidants at an accelerated rate (6). In patients with COPD, it appears that the increased oxidant production was not adequately buffered. The data suggest that antioxidant buffering did not fully adapt to the higher rate of production, leaving the trained muscle more susceptible to oxidative stress.

Which regulatory element failed to respond? The most obvious candidates are the enzymes that regulate GSH/GSSG cycling. Rabinovich and associates recognized this possibility and measured messenger ribonucleic acid (mRNA) concentrations for a key enzyme in GSH synthesis,  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase. Results of this analysis were not conclusive, however, and inadequate adaptation of the GSH/GSSG cycle cannot be ruled out. It is equally plausible that training compromised other antioxidant pathways that work in conjunction with GSH. For example, catalase, the superoxide dismutases,  $\alpha$ -lipoic acid, and vitamins E and C all contribute to antioxidant buffering. Losses in one or more of these pathways would increase the oxidative burden on GSH metabolism, predisposing the muscles to GSSG accumulation during exercise.

So what? Why might we care that GSSG concentrations rise during exercise? The obvious answer lies at the level of muscle function. The rise in GSSG indicates that antioxidant buffering is less effective and that activity of unbuffered oxidants is increased in the working muscle. Oxidants act directly on muscle myofilaments to decrease force production and predispose muscles of the respiratory pump and limbs to premature fatigue (7). Over the long haul, chronic increases in oxidant levels can also influence skeletal muscle gene expression (8). Deleterious effects that may result include accelerated muscle atrophy (9). If training predisposes the muscles of patients with COPD to such effects, it could be wildly counterproductive. Thus, the data of Rabinovich and associates call into question the basic strategy of exercise training for patient rehabilitation.

What is to be done? It is clear that additional data are needed to flesh out this limited but very stimulating report. Assuming the data are reproducible—and there is no reason to suppose otherwise—it becomes important to define the problem in greater detail. We need to know the extent to which training induces antioxidant insufficiency, the antioxidant pathways that are affected, and the degree to which antioxidant deficiency is linked to a specific training regimen. This information may make it possible to avoid antioxidant depletion by tailoring the training protocols appropriately. Alternatively, it may be possible to provide nutritional or pharmacologic supplements that limit oxidative stress in working muscle. The latter intervention has been considered in COPD for pulmonary pharmacotherapy (10) and may also prove beneficial for muscles.

Like Dr. Netter's painting, the data of Rabinovich and associates remind us that lung disease has remote effects on skeletal muscle. It has long been recognized that redox homeostasis is jeopardized by COPD. Rabinovich and associates have provided new evidence to reinforce this principle and to pointedly illustrate its unexpected impact on the muscles of patients.

MICHAEL B. REID, Ph.D.  
*Baylor College of Medicine*  
*Houston, Texas*



## References

1. Netter FH. Respiratory system. In: Divertie MB, editor. 2nd ed., vol. 7, The CIBA Collection of Medical Illustrations. Summit, NJ: CIBA Pharmaceutical Co., 1980. p. 148.
2. American Thoracic Society and European Respiratory Society. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:S1–S40.
3. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/ glutathione couple. *Free Rad Biol Med* 2001;30:1191–1212.
4. Rabinovich RA, Ardite E, Troosters T, Carbo N, Alonso J, Gonzalez de Suso JM, Vilaro J, Barbera JA, Polo MF, Argiles JM, Fernandez-Checa JC, Roca J. Reduced muscle redox capacity after endurance training in COPD patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1114–1118.
5. Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc* 1999;31:987–997.
6. Clanton TL, Zuo L, Klawitter P. Oxidants and skeletal muscle function: physiologic and pathophysiologic implications. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;222:253–262.
7. Reid MB. Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* 2001;90:724–731.
8. Jackson MJ. Free radicals in skin and muscle: damaging agents or signals for adaptation? *Proc Nutr Soc* 1999;58:673–676.
9. Kondo H. Oxidative stress in muscular atrophy. In: Sen CK, Packer L, Hanninen O, editors. Handbook of oxidants and antioxidants in exercise. New York: Elsevier; 2000. p. 631–653.
10. Buhl R, Meyer A, Vogelmeier C. Oxidant–protease interaction in the lung: prospects for antioxidant therapy. *Chest* 1996;110:267S–272S.



CARTA AL EDITOR

## Correspondence

---

### IS COPD ALSO A DISEASE OF SKELETAL MUSCLE?

*To the Editor:*

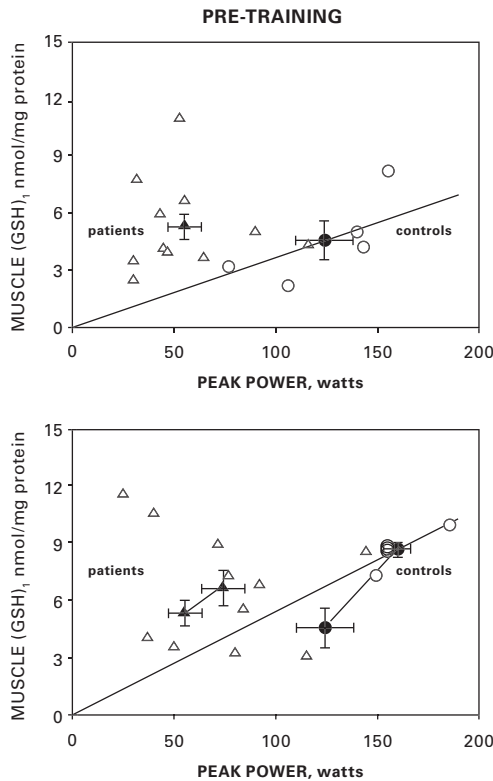
The article by Rabinovich and colleagues (1) and editorial by Reid (2) are very stimulating. Rabinovich's abstract ends "... patients with COPD showed a reduced ability to adapt to endurance training reflected in lower capacity to synthesize GSH" and Reid's title is "COPD as a muscle disease." They infer an intrinsic muscle defect in COPD that reflects a pathological state rather than different levels of activity and/or muscle environment. In the latter, muscle would function normally if activity and/or environment were restored; in the former, this would not happen. Which of these two possibilities proves correct may have therapeutic consequences.

Consider the GSH response as the product of the stimulus (amount of training) and the gain (GSH change per unit of training). Is the diminished response in COPD due to lower gain (i.e., muscle pathology) or just lesser stimulus? The stimulus was certainly less in COPD: peak watts increased by 14 from 48 to 62 in COPD, but by 36 from 124 to 160 in controls. Therefore one cannot refute the hypotheses that in COPD the lower GSH response was due to lower stimulus and ability to increase GSH with training is not impaired. Note that the authors could be correct. It may be that the relative training stimulus is more important than the absolute stimulus; however, we do not know that.

Rabinovich's data for GSH levels (in subjects with normal BMI) before and after training appear in Figure 1 as a function of exercise capacity. Both before (*top*) and after (*bottom*) training, most patients (*triangles*) had higher GSH levels in relation to peak power than the normal subjects (*circles*). Pretraining GSH levels were higher even in absolute terms in the patients. The capacity to form GSH is thus enhanced, not compromised, in COPD. In the *lower panel*, note the mean pre- and post-training data (*solid symbols*). The slopes are similar. Thus, much of the reater increase in GSH in the controls could be due to their greater increase in peak work rate.

Both the article and editorial should conclude only that in COPD, the GSH/GSSG system fails to respond as in normal subjects trained at much higher intensities. Whether this is due to reduced ability to respond, or due to lower training stimulus remains to be established. This does not lessen the value of either the article or the editorial. That the poor response in COPD may be due to a low stimulus and not pathology, the opposite of what is implied, is suggested by Figure 1, showing little difference in GSH response per watt gained with training. Rather, the data suggest that in COPD with normal BMI, the problem is predominantly low muscle use and limited increase in peak power with training due to the limitations imposed by the lung disease itself.

PETER D. WAGNER  
*University of California, San Diego  
 La Jolla, California*



**Figure 1.** Individual values for muscle [GSH]<sub>1</sub> as a function of peak power attained. Triangles represent patients, circles control subjects. Solid symbols are means  $\pm$  SE. Upper panel: before training; lower panel: after training (but with mean pre-training data also included for reference). Lines through origin are for visual comparison of patients to average response in control subjects. Most patient values lie above the mean control response; however, slope of the training response is similar.

1. Rabinovich RA, Ardite E, Troosters T, Carbó N, Alonso J, Gonzalez de Suso JM, Vilaró J, Barberà JA, Polo MF, Argilés JM, Fernandez-Checa JC, Roca J. Reduced muscle redox capacity after endurance training in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1114–1118.
2. Reid MB. COPD as a muscle disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1101–1102.

From the Author:

Dr. Wagner objects to the conclusion of Dr. Rabinovich and associates (1) and myself (2) that redox homeostasis appears defective in the muscles of trained patients with COPD. He points out that reduced glutathione content may have failed to change in patients with COPD because intensity of the training stimulus was too low. This is surely true. But it misses the point.

Dr. Rabinovich and his colleagues assessed “the effects of exercise training on limb muscle redox status” by measuring changes in both oxidized and reduced glutathione, GSSG and GSH, respectively. The GSSG/GSH redox couple is an established index of the cellular redox environment (3). But Dr. Wagner bases his argument on GSH alone. In redox chemistry, as in marital counseling, one ignores half a couple at one’s peril. GSH content is a gross index of the redox environment at best, and can be misleading. (By analogy, imagine assessing the metabolic status of exercising muscle by measuring pyruvate alone and ignoring lactate.)

Importance of the neglected GSSG data is apparent in Figure 2 of the original article by Rabinovich and colleagues (1). GSSG levels rose significantly in the muscles of trained patients with COPD after exercise, providing evidence of oxidative stress. This response was anomalous. GSSG did not increase after exercise in trained control subjects, nor did it increase in either group before training. The response was also unexpected. Training normally renders skeletal muscle more resistant to oxidative stress, not less (4).

A more comprehensive index of the redox environment is the relationship between GSSG and GSH or GSSG/GSH. Dr. Rabinovich and colleagues did not report changes in GSSG/GSH *per se*. However, average values can be approximated from Figures 1 and 2 (1). Before training, GSSG/GSH was essentially identical in the exercised muscles of control subjects (approximately 0.125) and patients with COPD (approximately 0.127). But training had opposite effects on the two groups. GSSG/GSH decreased in control subjects (approximately 0.103). In contrast, GSSG/GSH increased in patients with COPD (approximately 0.167), providing further evidence of oxidative stress.

Exercise-induced increases in both GSSG and GSSG/GSH argue against Dr. Wagner’s proposal that, “the poor response in COPD may be due to a low stimulus and not pathology.” The response of patients with COPD to training did not differ from normal by degree. The

difference was qualitative, explicitly abnormal. If one considers the data *en toto*, pathology seems the most logical explanation.

MICHAEL B. REID  
Baylor College of Medicine  
Houston, Texas

1. Rabinovich RA, Ardite E, Troosters T, Carbó N, Alonso J, Gonzalez de Suso JM, Vilaró J, Barberà JA, Polo MF, Argilés JM, Fernandez-Checa JC, Roca J. Reduced muscle redox capacity after endurance training in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1114–1118.
2. Reid MB. COPD as a muscle disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1101–1102.
3. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Rad Biol Med* 2001;30:1191–1212.
4. Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc* 1999;31:987–997.

*From the Authors:*

We thank Dr. Wagner for his thorough considerations on our work (1). The letter clearly addresses two relevant points:

(1) *Magnitude of the stimulus*. The arguments regarding effects of absolute versus relative intensity of the training stimulus on skeletal muscle are well taken, but conclusions should not be drawn from pre-training GSH data. Relative (not absolute) intensity of the training stimulus determines muscle adaptation. Although COPD patients ( $FEV_1$  38 ±4 % pred) were trained at a lower external power than healthy subjects, they showed similar post-training reduction of half-time phosphocreatine ([PCr]) recovery ( $^{31}P$ -NMRS) (-12.5±3.3 seconds versus -12.0±2.0 seconds, COPD and controls, respectively). Moreover, a subanalysis in the six COPD patients with low body mass index ( $FEV_1$  27±5 % pred) displayed an even higher post-training reduction of half-time [PCr] recovery (by -22±3 seconds) (p=0.02). These results indicate that in patients with severe pulmonary disease, the training stimulus produced substantial skeletal muscle adaptations.

Training generated different redox responses in COPD patients and in control subjects. Pre-training muscle GSH levels were not different between COPD patients and healthy sedentary subjects (5.36±0.72 and 4.6±1.03 nmol/

mg protein, respectively), yet COPD patients showed a significant relationship between  $\Delta$ GSSG (oxidized glutathione) and  $\Delta$ Wpeak after training (r=0.55, p=0.02). In these patients, no changes in GSH (reduced glutathione) were shown, despite upregulation of gamma-glutamyl cystein synthase (one of the key enzymes in the synthesis of GSH). Briefly, while training decreased muscle redox potential in these patients, the GSH/GSSG ratio increased after training in controls.

(2) *Heterogeneity of COPD patients*. The distinction among intrinsic muscle disease, muscle deconditioning, and dysfunction related to abnormal muscle environment was clearly beyond the scope of our study. We must acknowledge, however, that the subset of six low BMI patients showed a post-training fall in total glutathione (-0.90±0.66 nmol/mg protein, p=0.04) not seen in normal BMI patients (2.0±1.11 nmol/mg protein) or in healthy subjects (4.27±1 nmol/mg protein p=0.01 each). Our group is actively working on the notion that although COPD patients with low fat free mass (FFM) may constitute a subset of COPD patients with intrinsic muscle disease, COPD patients with normal FFM may predominantly show the effects of muscle deconditioning. This hypothesis raises a potential debate on the rationale for different types of interventions to enhance physiological adaptations to endurance training in COPD patients that will remain speculative until further progress in this area is achieved.

ROBERTO A. RABINOVICH  
JOSEP ROCA  
Hospital Clinic, IDIBAPS, University of Barcelona  
Barcelona, Spain

1. Rabinovich RA, Ardite E, Troosters T, Carbó N, Alonso J, Gonzalez de Suso JM, Vilaró J, Barberà JA, Polo MF, Argilés JM, Fernandez-Checa JC, Roca J. Reduced muscle redox capacity after endurance training in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1114–1118.



# Índice

Agradecimientos	7
Presentación	9
Introducción	11
La Disfunción Muscular en la EPOC	13
ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL MÚSCULO SANO	14
CAMBIOS FISIOPATOLÓGICOS EN EL MÚSCULO PERIFÉRICO DEL PACIENTE CON EPOC	18
Fibras musculares	18
Alteraciones de la capilarización y del transporte de oxígeno muscular	19
Alteración de la bioenergética muscular	20
Pérdida de masa muscular	22
CAMBIOS ETIOPATOGÉNICOS DE LA DISFUNCIÓN MUSCULAR EN LA EPOC	23
Alteraciones en el recambio proteico	23
Trastornos nutricionales	24
Sedentarismo	25
Corticosteroides	25
Hipoxia tisular e hipercapnia	26

<b>Inflamación sistémica</b>	27
<b>Estrés oxidativo/nitrosativo</b>	28
Los Músculos Respiratorios en la EPOC	29
Sedentarismo y Entrenamiento Muscular en la EPOC	31
El Estrés Oxidativo/Nitrosativo como Mecanismo Patogénico	35
Objetivos	41
OBJETIVO I - EFECTOS DEL ENTRENAMIENTO SOBRE EL SISTEMA GLUTATION	41
<b>Manuscrito I</b>	42
<i>Hipótesis</i>	42
<i>Objetivo específico</i>	42
OBJETIVO II - RELACIONES ENTRE ESTRÉS OXIDATIVO Y PERDIDA DE MASA MUSCULAR	42
<b>Manuscrito II</b>	43
<i>Hipótesis</i>	43
<i>Objetivo específico</i>	43
OBJETIVO III - INTERACCIONES ENTRE INFLAMACIÓN Y EJERCICIO	43
<b>Manuscrito III</b>	44
<i>Hipótesis</i>	44
<i>Objetivo específico</i>	44
OBJETIVO IV - ALTERACIONES DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL Y DISFUNCIÓN MUSCULAR	44
<b>Manuscrito IV</b>	45
<i>Hipótesis</i>	45
<i>Objetivo específico</i>	45
Trabajos Originales	47



---

MANUSCRITO I	47
MANUSCRITO II	57
MANUSCRITO III	65
MANUSCRITO IV	75
Resumen de Resultados	89
MANUSCRITO I	89
MANUSCRITO II	90
MANUSCRITO III	90
MANUSCRITO IV	91
Discusión	93
EFECTOS DEL ENTRENAMIENTO SOBRE EL SISTEMA GLUTATION	93
RELACIONES ENTRE ESTRÉS OXIDATIVO Y PÉRDIDA DE MASA MUSCULAR	94
INTERACCIONES ENTRE INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO	96
RELACIÓN ENTRE DESACOPLAMIENTO DE LA CADENA RESPIRATORIA Y DISFUNCIÓN MUSCULAR	104
Resumen	107
Conclusiones	109
Perspectivas de Futuro	111
Bibliografía	113
Acrónimos	125
Anexo	127
EDITORIAL	127
CARTA AL EDITOR	131

