

## Fracaso de los músculos respiratorios en la sepsis

E. Barreiro<sup>a,b</sup> y S.N.A. Hussain<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Neumología. Hospital del Mar-IMIM, Universidad Pompeu Fabra. Barcelona. <sup>b</sup>Critical Care & Respiratory Divisions. Royal Victoria Hospital y Meakins-Christie Laboratories. McGill University. Montreal. Quebec. Canadá.

### Introducción

El objetivo de este artículo de revisión es hacer una exposición actualizada y sistemática de los mecanismos moleculares subyacentes a la disfunción de los músculos ventilatorios en la sepsis. La temática se ha dividido en diversos apartados con el objetivo de facilitar la comprensión al lector. En primer lugar, se detalla la importancia del estudio de los músculos respiratorios, ya que son las estructuras principales que componen la bomba ventilatoria. En segundo lugar, se resume brevemente en qué consisten la sepsis y el shock séptico, para a continuación detallar los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la disfunción de los músculos ventilatorios en estos síndromes. Más específicamente, se han centrado los objetivos de este artículo en la revisión de dos de los factores más clara y ampliamente implicados en el desarrollo del fracaso de la bomba ventilatoria en la sepsis, como son el óxido nítrico y las especies reactivas de oxígeno. Por último, se hace mención a la enzima conocida como hemooxigenasa, ya que se ha demostrado recientemente su capacidad protectora en la disminución de la contractilidad diafragmática inducida por la sepsis.

### Músculos respiratorios

Los músculos ventilatorios son estructuras constituidas por tejido muscular esquelético estriado. Dichos músculos controlan el desplazamiento rítmico de la pared torácica para mover aire hacia fuera y hacia dentro del organismo con la finalidad de mantener los gases arteriales dentro de márgenes de normalidad<sup>1</sup>. Las diferencias existentes entre los músculos respiratorios y los músculos esqueléticos de las extremidades están directamente relacionadas con la función que deben ejercer. En este sentido, los músculos ventilatorios están diseñados para vencer cargas resistivas y elásticas, que están sujetas tanto a un control voluntario como involuntario. Además, la longitud de reposo de los músculos respiratorios viene establecida por el equilibrio existente entre

las fuerzas de retracción elástica pulmonar y las de expansión de la caja torácica<sup>2,1</sup>. Cabe añadir que su función es esencial para la vida, ya que han de contraerse rítmicamente y generar las presiones necesarias para la ventilación a lo largo de toda la existencia del individuo<sup>3</sup>. Por último, y basado en sus acciones mecánicas, los músculos ventilatorios se clasifican, en general, en inspiratorios y espiratorios. Estas acciones pueden ser llevadas a cabo por varios grupos de músculos con el fin de asegurar los medios por los cuales el aire puede ser movido eficazmente en cualquier situación fisiológica o fisiopatológica<sup>4</sup>.

### Sepsis. Definiciones, etiología y patogenia

La respuesta sistémica a una infección grave en forma de fiebre, taquicardia, taquipnea, leucocitosis y síntomas característicos de la infección localizada se conoce como sepsis. Se habla de shock séptico cuando esta situación clínica se acompaña de hipotensión o de fallo multiorgánico, que afecta a órganos como el sistema nervioso central, el corazón, los riñones, el hígado, el tracto gastrointestinal, el sistema inmunitario y los pulmones (fig. 1). La respuesta cardiovascular del shock séptico viene caracterizada por una primera fase hiperdinámica acompañada de hipotensión, un gran aumento del gasto cardíaco y un descenso de las resistencias vasculares periféricas. Por el contrario, la fase tardía o hipodinámica se asocia a una hipotensión grave, un bajo gasto cardíaco y un gran aumento de las resistencias vasculares totales. La incidencia de sepsis y shock séptico ha aumentado considerablemente en los últimos 70 años. Actualmente, es una de las causas más importantes de muerte en las unidades de cuidados intensivos<sup>5</sup>. Las bacterias gramnegativas son la causa más frecuente de todos los síndromes de shock séptico, si bien microorganismos grampositivos y hongos pueden también formar parte de la etiología de esta enfermedad. La endotoxina bacteriana, el lipopolisacárido (LPS) asociado a la membrana de los microorganismos gramnegativos, constituye el mediador clásico de la cascada patogénica del shock séptico. Esta molécula consta de un núcleo interno formado de oligosacáridos, común entre las bacterias gramnegativas, de un núcleo externo compuesto de oligosacáridos antigénica y estructuralmente distintos y, por último, del lípido A, que es el responsable de la mayoría de propiedades tóxicas de la endotoxina. La

Correspondencia: Dra. E. Barreiro.  
Servicio de Neumología. Hospital del Mar-IMIM.  
Dr. Aiguader, 80. 08003 Barcelona.  
Correo electrónico: ebarreiro@imim.es

Recibido: 23-10-2001; aceptado para su publicación: 4-12-2001.

administración de la endotoxina a animales de experimentación provoca una respuesta cardiovascular similar a la descrita en los pacientes con un shock séptico. También se ha constatado que la administración de pequeñas dosis de endotoxina a individuos sanos da lugar a fiebre, síntomas constitucionales leves y una respuesta cardiovascular similar a la observada en los pacientes sépticos. Además, se ha descrito una asociación entre el incremento de la mortalidad por sepsis y la presencia de endotoxina plasmática en pacientes con shock séptico y cultivos sanguíneos positivos, lo que sugiere que la endotoxina bacteriana es uno de los mediadores más importantes en el desarrollo de esta entidad.

*Evidencia del fracaso de los músculos respiratorios en la sepsis. Revisión histórica*

Tradicionalmente, el fracaso respiratorio en la sepsis se ha atribuido al daño pulmonar con infiltración bilateral, que da lugar a un deterioro del intercambio de gases, una disminución de la distensibilidad pulmonar y un aumento del cortocircuito (*shunt*) pulmonar. Por otro lado, se ha demostrado recientemente que el shock séptico también se asocia al fracaso de la bomba ventilatoria. En este sentido, Burke et al<sup>6</sup> observaron la existencia de una insuficiencia respiratoria hipercápnica con normoxemia en los pacientes con una sepsis fulminante. En otro estudio se describió la existencia de una disfunción muscular diafragmática, tanto clínica como electromiográfica, en los pacientes con una sepsis grave que no podían ser desconectados de la ventilación mecánica<sup>7</sup>. Este hallazgo se basa en las aportaciones descritas por Friman<sup>8</sup>, quien observó que tanto la fuerza máxima como la resistencia de varios músculos periféricos estaban disminuidas durante el curso de infecciones agudas en pacientes<sup>8</sup>.

Algunos estudios posteriores han demostrado que el shock experimental, consistente en la administración a animales de experimentación de microorganismos vivos o de endotoxina bacteriana, genera una respuesta cardiovascular similar a la observada en la fase hipodinámica del shock séptico en los seres humanos. En esta misma línea, Hussain et al<sup>9</sup> describieron que el fracaso ventilatorio observado en los perros durante el curso del shock séptico tras la administración de la endotoxina de *Escherichia coli* fue debido a la fatiga de los músculos respiratorios que, a su vez, condujo a una insuficiencia respiratoria hipercápnica<sup>9</sup>. Otros estudios han demostrado una reducción de la fuerza de contracción diafragmática en respuesta a altas frecuencias de estimulación en la endotoxemia aguda<sup>10</sup> y prolongada<sup>11</sup>, así como a un amplio espectro de frecuencias de estimulación en la endotoxemia crónica<sup>12</sup>. Por otro lado, la resistencia diafragmática se encontró significativamente disminuida en respuesta a bajas frecuencias de estimulación en todos estos estudios. En un estudio más reciente efectuado en ratas se ha descrito que la peritonitis aguda se asocia a debilidad diafragmática, lo que sugiere que los pacientes con dicha enfermedad también podrían estar predispuestos al desarrollo de disfunción de los músculos respiratorios<sup>13</sup>.

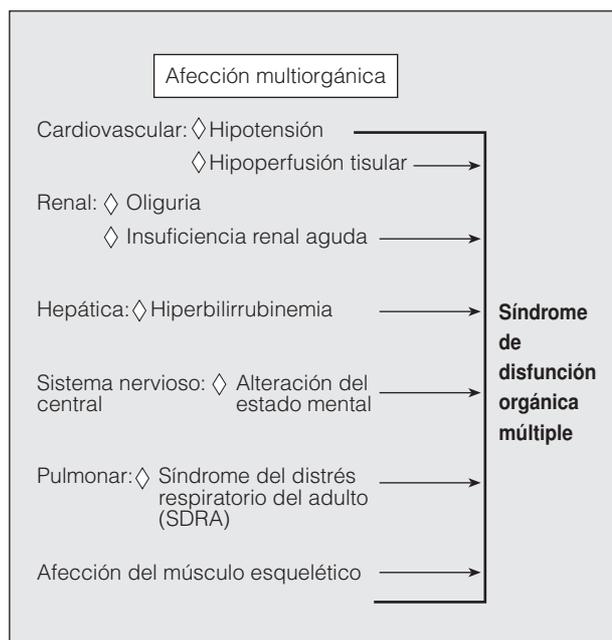


Fig. 1. Representación de los diferentes sistemas y órganos afectados en la sepsis.

**Factores implicados en el desarrollo del fracaso de los músculos respiratorios inducido por la sepsis**

*Factores ventilatorios, metabólicos y hemodinámicos*

Este grupo de factores son la consecuencia del desequilibrio existente entre las necesidades metabólicas aumentadas de los músculos ventilatorios (debido al incremento de la ventilación, la hipoxemia y las elevadas resistencias pulmonares) y la pobre extracción de oxígeno y nutrientes por parte del músculo esquelético (fig. 2). Las demandas ventilatorias aumentadas en la sepsis<sup>14</sup>, así como el hecho de que el flujo sanguíneo muscular esté, en función de la presión arterial sistémica, en situaciones de muy baja presión<sup>15</sup>, hacen predecir que este flujo muscular será insuficiente para satisfacer sus necesidades metabólicas, dando lugar a un incremento del metabolismo anaeróbico y la consiguiente producción de ácido láctico<sup>16</sup>. Por otro lado, la sepsis también se asocia a alteraciones metabólicas que implican la utilización de carbohidratos, lípidos y proteínas, que pueden contribuir a la disminución de la capacidad contráctil del músculo esquelético<sup>14</sup>.

*Mediadores de la disfunción muscular*

Este grupo de factores incluye deficiencias específicas celulares, metabólicas e inmunitarias que interfieren con una serie de procesos necesarios para la generación de la fuerza muscular (figs. 2 y 3). Estos defectos son la consecuencia de complejas interacciones entre mediadores sistémicos y locales que, en conjunto, dan lugar a la disfunción de los músculos respiratorios descrita en la sepsis. A continuación, cada uno de los factores se describe por separado. De entre ellos, el óxido ní-

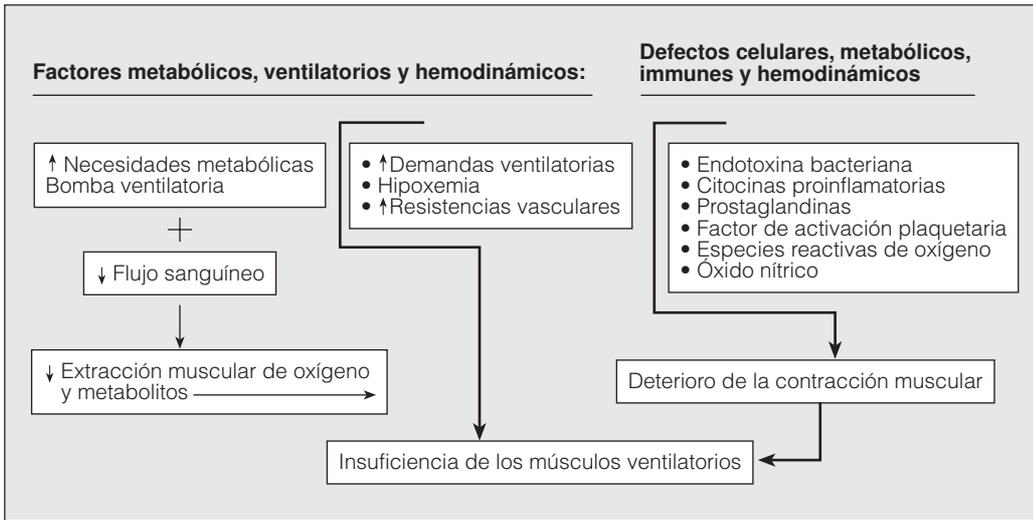


Fig. 2. Esquematación de los factores implicados en el desarrollo del fracaso de los músculos ventilatorios en la sepsis. A la izquierda están representados los factores ventilatorios, metabólicos y hemodinámicos. En la parte de la derecha se representa el grupo de los mediadores.

trico (NO) y las especies reactivas de oxígeno (ROS) constituyen los mediadores más importantes, motivo por el que serán tratados ampliamente en secciones independientes.

**Endotoxina bacteriana.** No hay una evidencia clara de que la endotoxina de *E. coli* tenga efectos directos sobre la contractilidad diafragmática *in vivo*<sup>17</sup>, si bien clásicamente se ha propuesto como desencadenante de una serie de sucesos que conllevarían, en última instancia, el desarrollo de un fracaso muscular.

**Metabolismo del ácido araquidónico.** Boczkowski et al<sup>11</sup> demostraron que la administración previa de indometacina, un inhibidor de la ciclooxigenasa, prácticamente abrogó la disminución de la contractilidad diafragmática observada tras tres días de endotoxemia en

ratas. Resultados similares se obtuvieron en respuesta a la endotoxemia aguda en cochinitos (*piglets*) tras la administración también de indometacina<sup>18</sup>. Además, en este estudio la infusión sistémica de un análogo del tromboxano A<sub>2</sub> redujo la contractilidad diafragmática de forma similar a la descrita en la endotoxemia.

**Citocinas.** Está bien establecido que la endotoxina tiene capacidad para estimular a monocitos, macrófagos y células mastoideas productoras de citocinas, tales como el factor de necrosis tumoral α (TNF-α) y la interleucina-1 (IL-1). Por otro lado, se sabe también que el TNF-α es el mediador central de respuestas inmunitarias e inflamatorias, por lo que ha sido objeto de numerosos estudios. En este sentido, se ha evidenciado una disminución de la contractilidad diafragmática en perros<sup>19</sup> tras la infusión de TNF-α, así como incrementos del ARN mensajero (ARNm) de TNF-α en el diafragma de ratas tras la infusión sistémica de endotoxina<sup>20</sup> y una reducción de la contractilidad de este músculo. Esta última resultó ser parcialmente reversible tras la administración previa de anticuerpos anti-TNF-α a los animales<sup>20</sup>. Los mecanismos por los que el TNF-α ejerce sus efectos deletéreos en el músculo esquelético no se han establecido claramente, si bien se cree que esta citocina actuaría mediante la inducción de moléculas de tipo mensajero secundario, como el NO y las ROS, cuyos mecanismos de acción se detallarán a continuación.

**Óxido nítrico**

El óxido nítrico (NO) es una molécula multifuncional que participa en numerosos e importantes procesos biológicos como, por ejemplo, la vasodilatación, la broncodilatación, la neurotransmisión, la inhibición de la agregación plaquetaria y fagocitaria, y la actividad antimicrobiana<sup>21-23</sup>. Se trata de una molécula sin carga, cuyo último orbital sólo contiene un electrón. Esta característica física le confiere la capacidad de difundir a través de los tejidos con escasa reactividad, a excepción de la

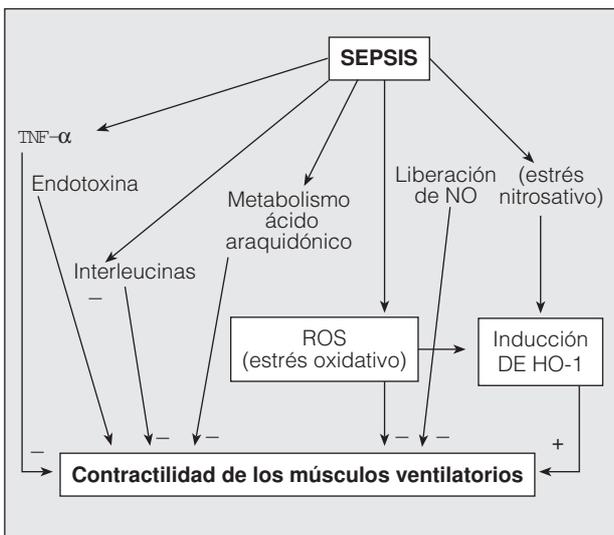


Fig. 3. Representación de los principales mediadores de la disfunción muscular en la sepsis. La enzima hemooxigenasa 1 (HO-1), la isoforma inducible, aparece como una molécula potenciadora de la contractilidad muscular, disminuida en la sepsis.

que tiene con moléculas, cuyos últimos orbitales contienen un solo electrón, como los radicales libres y los metales de transición<sup>24</sup>. Desde un punto de vista bioquímico, los mecanismos de acción del NO pueden simplificarse en tres tipos de reacciones. Por un lado, el NO puede actuar como molécula señalizadora (*signalling*) a través de la unión y activación de la enzima guanilato ciclasa<sup>24</sup>. También puede ser destruido mediante una reacción con la oxihemoglobina de las células rojas para formar nitrato<sup>25</sup>. Por último, el NO puede convertirse en peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) a través de su unión con el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), cuya reacción suele estar limitada por la presencia de concentraciones micromolares de superóxido dismutasas (SOD) en las células<sup>24</sup>. Esta última reacción del NO con el anión superóxido se explicará posteriormente en una sección independiente.

El NO se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina por un grupo de hemoproteínas conocidas como NO sintetasas (NOS) en presencia de nicotinamidaadeninucleótido fosfato hidrogenado (NADPH) y tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>)<sup>26</sup> (fig. 4). Se han identificado tres isoformas, dos de las cuales se expresan constitutivamente y se purificaron de forma originaria en las células endoteliales (eNOS, NOS3) y en el cerebro (nNOS, NOS1). La tercera enzima, que es la inducible, se purificó inicialmente en los macrófagos (iNOS, NOS2). Los requerimientos para calcio y calmodulina difieren entre eNOS y nNOS por un lado, e iNOS por otro, y las tres isoenzimas se encuentran ampliamente distribuidas en los tejidos (fig. 4).

### Localización y expresión de las NOS en el músculo esquelético

#### nNOS

Kobzik et al<sup>27</sup> demostraron que nNOS se localiza en el sarcolema de las fibras musculares tipo II del músculo esquelético de la rata. Por el contrario, otros estudios basados en el músculo esquelético humano han demostrado una distribución equitativa de nNOS en el sarcolema, tanto de fibras tipo I como tipo II.

La expresión de nNOS en los músculos ventilatorios de las ratas se incrementó en respuesta a la sobrecarga mecánica mediante la aplicación de cargas resistivas<sup>28</sup>. Asimismo, la endotoxemia en ratas también ha resultado ser un estímulo para el incremento de la expresión proteica de nNOS, fundamentalmente en el diafragma y, en menor escala, en los músculos intercostales y el gastrocnemio<sup>29</sup>. En otro estudio más reciente<sup>30</sup>, en el que se utilizaron ratones deficientes en el gen de la nNOS (ratones nNOS *knockout*), concluimos que esta isoforma podría ejercer un papel protector en la prevención del deterioro de la fuerza de contracción diafragmática inducida por la inyección sistémica del LPS de *E. coli*. Esta conclusión se basó en el hecho de que los animales deficientes en dicha isoenzima presentaron una mayor disminución en la contractilidad diafragmática respecto a los animales que expresaban nNOS en músculos control y sépticos. Sin embargo, a pesar de la localización de nNOS en el sarcolema de las fibras musculares, tam-

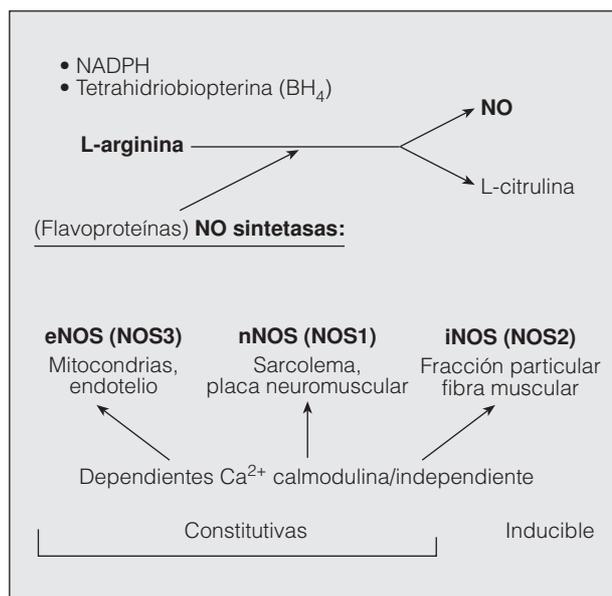


Fig. 4. Esquema de la síntesis del óxido nítrico (NO) en la parte superior. En la parte inferior se representan los tres tipos de isoformas de las sintetasas del óxido nítrico (NOS) en el músculo esquelético: de izquierda a derecha, la endotelial (eNOS), la neuronal (nNOS) y la inducible (iNOS).

bién demostramos en este mismo trabajo que esta isoenzima no está implicada en el desarrollo del daño de membrana observado en las fibras musculares de animales sépticos<sup>30</sup>.

#### eNOS

Kobzik et al<sup>31</sup> también demostraron que en la rata esta isoforma se localiza en las mitocondrias de las fibras musculares. La endotoxemia en ratas también ha resultado ser un estímulo para el incremento de la expresión de la proteína eNOS en el diafragma y gastrocnemio de la rata<sup>32,33</sup>.

#### iNOS

Tanto los valores de ARNm como los de la proteína de la isoforma iNOS han sido indetectables en varios músculos esqueléticos normales de rata y ratón<sup>32,35</sup>. Sin embargo, Gath et al<sup>36</sup> demostraron la expresión de iNOS en músculos normales de cobayas en el ARNm, la proteína y la actividad enzimática, sugiriendo una expresión "constitutiva" de esta isoforma en el músculo esquelético. Esta isoforma se localiza en la fracción particular de la célula muscular y, específicamente, en el retículo sarcoplásmico y/o en el sistema tubular transverso. Por otro lado, tanto Boczkowski et al<sup>34</sup> como Hussain et al<sup>32,33</sup> han demostrado recientemente un incremento sistemático en la expresión y la actividad de la iNOS muscular en respuesta a la inyección del LPS de *E. coli* en el diafragma<sup>32-34</sup> y en los músculos intercostales y el sóleo<sup>32</sup> de ratas, cuyo pico máximo se alcanzó a las 12 h de la endotoxemia. Además, El Dwarri et al<sup>33</sup> demostraron en su trabajo que la contractilidad

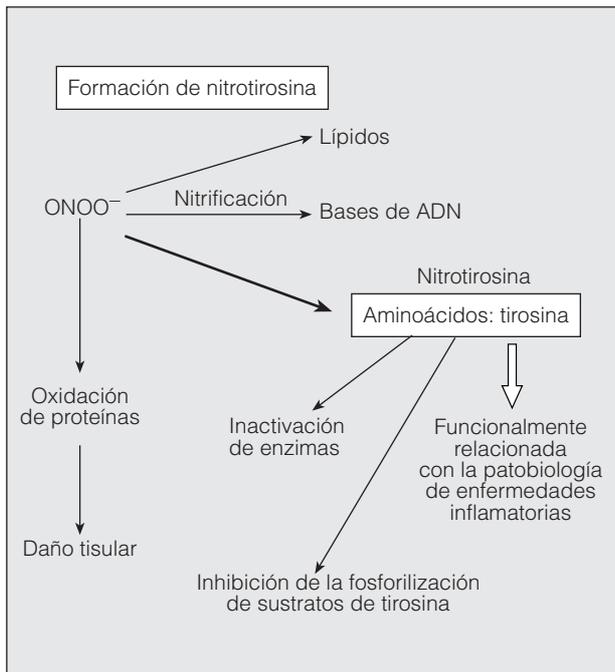


Fig. 5. Esquema de los diferentes efectos de la especie reactiva de oxígeno peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Esta especie puede oxidar directamente proteínas (parte izquierda) o puede nitrificar diversas moléculas. Entre ellas, el aminoácido tirosina es la molécula diana para dicho proceso. La formación de nitrotirosina puede alterar las funciones de las proteínas o actuar como marcador del estado de estrés nitrosativo celular.

diafragmática estaba significativamente disminuida tras 12 h de endotoxemia, al mismo tiempo que se evidenció la expresión de iNOS y el incremento de su actividad. Este efecto inhibitorio sobre la contractilidad diafragmática inducido por la sepsis se atribuyó al exceso de producción de NO, mediatizado por la formación de peroxinitrito<sup>33</sup>. Por otro lado, el mismo grupo de investigadores concluyó más recientemente<sup>37</sup> que la isoforma iNOS podría tener un papel protector frente a los efectos inhibitorios ejercidos por el LPS de *E. coli* sobre la contractilidad muscular diafragmática, dado que la ausencia total (ratones iNOS *knockout*) de dicha proteína dio lugar a una mayor disminución de la fuerza y resistencia del diafragma en animales sépticos<sup>37</sup>. En este mismo estudio<sup>33</sup> también se demostró que la ausencia del gen para la isoenzima iNOS fue responsable del incremento en la expresión de nNOS en respuesta a la sepsis. Esto sugiere que la isoenzima iNOS regula la expresión de nNOS, ya sea de forma transcripcional, proteica o en el ARNm.

### Fisiología del NO en el músculo esquelético

Los estudios existentes en la actualidad sobre la fisiología del NO en el músculo esquelético se han realizado, con animales de experimentación o con fibras musculares aisladas, mediante el uso de donantes de NO o de inhibidores, que en algunas ocasiones hacen difícil su traducción fisiológica. Sin embargo, parece claro que el NO desempeñaría un papel en el acopla-

miento excitación-contracción en el sarcolema, el retículo sarcoplásmico o los miofilamentos, en el consumo de glucosa, la regulación del flujo sanguíneo hacia el músculo, el consumo de oxígeno mitocondrial, el daño muscular, y, por último, parece también ejercer un papel en el proceso de diferenciación de los mioblastos<sup>38</sup>.

### Peroxinitrito y formación de nitrotirosina

#### Descripción de un fenómeno

La producción excesiva de NO, como ocurre en los procesos activos inmunoinflamatorios, conlleva efectos deletéreos en los tejidos, que han sido atribuido a su reacción limitada por la difusión con el superóxido para formar el potente y tóxico oxidante peroxinitrito. En la actualidad, se considera que esta especie altamente reactiva es la máxima responsable de los efectos lesionantes de la excesiva producción de NO en los tejidos<sup>24</sup>. Cuando las concentraciones de NO alcanzan valores del orden del micromol, este radical compite con las SOD celulares por el superóxido, dado que esta reacción es tres veces más rápida que la de aquellas enzimas con el superóxido. De aquí se deduce que la formación de la especie peroxinitrito es la consecuencia de la producción excesiva de NO y superóxido, condición que invariablemente sucede en los procesos activos inmunoinflamatorios<sup>39</sup>. La especie reactiva peroxinitrito ejerce sus efectos a través de modificaciones oxidativas que implican la nitrificación de aminoácidos aromáticos, lípidos o bases de ADN<sup>40-42</sup>. De entre ellos, el aminoácido tirosina parece ser la molécula diana para dicho proceso de nitrificación (fig. 5). De hecho, actualmente se considera que la formación de 3-nitrotirosina es un potente marcador biológico *in vivo* de la generación de especies reactivas de nitrógeno<sup>39</sup>. Además, existe cada vez mayor evidencia de que la nitrificación de residuos esenciales de tirosina puede inactivar enzimas o bloquear la fosforilación de los sustratos de tirosina cinasas. De todo esto se deduce que el fenómeno de nitrificación de residuos de tirosina se considera actualmente como un mediador directo de los procesos activos inmunoinflamatorios y no sólo un mero marcador biológico *in vivo* del estrés nitrosativo.

#### Formación de nitrotirosina. ¿Marcador o mediador?

Se ha observado recientemente la presencia abundante de proteínas nitrificadas en enfermedades como la sepsis, el daño pulmonar agudo, la artritis reumatoide, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Alzheimer y el trasplante hepático<sup>24,43</sup>. Estudios recientes han demostrado, además, que diversas proteínas, como Mn-SOD<sup>44</sup>, neurofilamento L<sup>45</sup>, actina y otras proteínas del citosqueleto<sup>46</sup>,  $\alpha$ -tubulina<sup>47</sup>, tirosina hidrolasa<sup>46</sup>, proteína A del surfactante pulmonar y  $\alpha$ -1-antitripsina<sup>48</sup>, tienen sus residuos de tirosina nitrificados. Este fenómeno de nitrificación se ha detectado en tejidos diversos y en la mayor parte de los casos la formación de nitrotirosina tuvo como consecuencia la inhibición de la actividad de la proteína correspondiente. Más específica-

mente, los datos recientes de nuestro laboratorio, todavía no publicados, han puesto de manifiesto la presencia abundante de proteínas nitrificadas de localización en el citosol de las fibras musculares de diversos músculos normales de la rata. En este caso, tanto las NOS constitutivas, eNOS y nNOS, como la isoforma inducible contribuyeron a la formación de nitrotirosina. A su vez, la inducción de sepsis en dichos animales de experimentación se relacionó con un incremento significativo en la formación de nitrotirosina, especialmente en las fracciones mitocondrial y de membrana de diversos músculos esqueléticos. También demostramos a partir de estos experimentos que la isoforma que más contribuyó a la formación de nitrotirosina fue la inducible, iNOS.

En este estudio se demostró que el proceso de nitrificación estaba limitado a unas bandas específicas de proteínas, ya que este fenómeno es muy selectivo y depende de varios factores, como la exposición del anillo aromático a la superficie de la proteína y la presencia de glutamato en la vecindad del residuo de tirosina. Sin embargo, la abundancia de residuos de tirosina en una proteína determinada o de proteínas en un tejido no condiciona el fenómeno de nitrificación en el mismo<sup>43</sup>. La identificación de las proteínas nitrificadas detectadas en nuestro estudio no formó parte de los objetivos de este trabajo. Si bien se ha especulado acerca de qué proteínas podría tratarse, teniendo en cuenta que la mayor parte de la formación de nitrotirosina se localiza en el citosol de los músculos control y que el incremento de las proteínas nitrificadas, en respuesta a la sepsis, se localiza en los compartimientos de membrana y mitocondrial del músculo esquelético de la rata. Por tanto, y en función de sus pesos moleculares aparentes y del tipo de tejido y la localización, nos parece probable que las proteínas nitrificadas detectadas fueran  $\alpha$ -tubulina, F-actina y otras proteínas que conforman el citoesqueleto de la fibra muscular. La eventual confirmación de nuestra hipótesis de que el fenómeno de nitrotirosina acontece sobre todo en el citoesqueleto de la fibra muscular esquelética contribuiría a la expansión del conocimiento de los mecanismos, por los que el exceso de producción de NO contribuye a la disfunción muscular en la sepsis.

### Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Los radicales libres, y especialmente el anión superóxido, se producen en el músculo esquelético normal a partir de diversas fuentes que se detallan a continuación.

#### *Cadena mitocondrial de transporte de electrones*

Los radicales libres de oxígeno son mediadores normales de las reacciones en cadena del transporte de electrones en la mitocondria<sup>49</sup>. El producto final de una serie de reacciones que tienen lugar como consecuencia del metabolismo del oxígeno es la formación del anión superóxido. La tasa de producción de este radical es proporcional a la presión parcial de oxígeno en la mitocondria<sup>50</sup>. El hecho de que el ejercicio intenso se acom-

pañe de un incremento en la utilización de oxígeno hace pensar que la liberación de superóxido podría también estar aumentada en el músculo que se contrae<sup>50</sup>. Por otro lado, también se ha propuesto que la producción de grandes cantidades de superóxido puede llegar a saturar las defensas antioxidantes mitocondriales, dando lugar a un escape de superóxido hacia el citosol y otros lugares de la fibra muscular, que constituirían el primer paso en el daño tisular<sup>51,52</sup>. De todo esto se deduce que la mitocondria desempeña un papel central en la producción de radicales libres en el músculo que se contrae.

#### *Xantina oxidasa*

La conversión de hipoxantina a xantina y ácido úrico mediante la acción de la xantina oxidasa da lugar a la formación de ROS, que varía mucho entre especies y tejidos. Esta vía ejerce un papel importante en la producción de superóxido y en el daño tisular muscular tras períodos de isquemia y reperfusión en animales de experimentación<sup>53</sup>.

#### *NADPH oxidasa*

Recientemente, este sistema se ha identificado como fuente de producción de ROS en las células no fagocíticas. Se trata de un sistema enzimático complejo asociado a la membrana que se encuentra en células de origen mesodérmico y en leucocitos, donde la producción de superóxido se utiliza para eliminar organismos extraños, si bien la generación excesiva de dichos radicales puede inducir daño tisular. Nuestro grupo ha demostrado la existencia de un sistema NADPH oxidasa en el interior de la fibra muscular<sup>54</sup>, de características muy similares a las descritas en otros tejidos. Este sistema enzimático ha resultado ser activo dentro de las fibras musculares y capaz de producir ROS tanto en músculo control como en respuesta a la sepsis.

#### *Sistema microsomal P-450*

Se ha constatado que es un sistema importante en la producción de radicales libres y daño tisular en respuesta a la administración de oxígeno y diversas toxinas celulares<sup>50</sup>.

#### *Productos del metabolismo del ácido araquidónico*

Se ha descrito como fuente importante de producción de radicales libres en el cerebro tras períodos de isquemia<sup>55</sup>.

### Efectos de las ROS en la contracción del músculo esquelético

Los efectos de las ROS sobre la función del músculo esquelético se asocian siempre a ciertas condiciones fisiopatológicas musculares, como la fatiga tras el ejercicio intenso, el daño por isquemia-reperfusión, las enfermedades inflamatorias musculares y otras miopatías<sup>56</sup>. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que las

ROS endógenas también regulan la función contráctil del músculo sano<sup>57</sup>. Se producen a relativa baja concentración en el músculo en reposo, son esenciales para la producción normal de fuerza muscular y sus valores se incrementan progresivamente en respuesta a la activación muscular<sup>57-59</sup>. Los valores de ROS se mantienen relativamente bajos gracias a la acción de los sistemas antioxidantes intracelulares como las SOD. Además, se ha observado que la reducción selectiva de ROS mediante la administración de catalasa o SOD provoca una disminución de la fuerza que es reversible tras la eliminación de la correspondiente enzima<sup>60,61</sup>. Por el contrario, la exposición a bajos valores exógenos de ROS incrementa la fuerza muscular<sup>60,62</sup>. Si bien la producción excesiva de ROS, como ocurre en las contracciones musculares intensas o en la sepsis, genera un estado de estrés oxidativo que conlleva una disminución de la producción de fuerza por parte del músculo esquelético<sup>58</sup>.

### Estrés oxidativo en el músculo esquelético en la sepsis

Diversos estudios han demostrado que el daño del músculo esquelético inducido por la sepsis está en gran parte mediado por un incremento en la producción de ROS. En atención a esto Shindoh et al<sup>12,63</sup> fueron los primeros en describir que los radicales libres también contribuyen a la disfunción diafragmática inducida por la inyección sistémica de la endotoxina bacteriana. Estos autores concluyeron que la previa administración de polietilenglicol-superóxido dismutasa (PEG-SOD) (antioxidante) previno la formación de malondialdehído (MDA) (uno de los índices de peroxidación lipídica mediada por ROS), así como la disfunción contráctil en hámsters sépticos. Peralta et al<sup>64</sup> demostraron un incremento de los valores de ROS en los músculos de las extremidades de ratas sépticas, que se atenuó previa administración de SOD. El mismo grupo de investigadores<sup>65</sup> reseñó en otro estudio la existencia muy precoz de estrés oxidativo, junto con una inhibición de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial e inactivación de los sistemas antioxidantes en los músculos de ratas sépticas. Supinski et al<sup>66</sup> concluyeron que la disfunción muscular inducida por la endotoxina bacteriana no sólo se hizo extensiva a los músculos ventilatorios, sino también a los músculos de las extremidades, mientras que el músculo miocárdico resultó ser resistente a los efectos de dicha sustancia. Estudios muy recientes han demostrado en ratas que los radicales libres reducen el consumo máximo de oxígeno del diafragma en la sepsis<sup>67</sup>, y tienen un papel central en la alteración de la capacidad de generar fuerza por parte de las proteínas contráctiles de dichos diafragmas sépticos<sup>68</sup>.

La importancia del estudio del fenómeno de oxidación de proteínas radica en el hecho de la modificación de las propiedades bioquímicas de éstas, induciendo cambios en su actividad enzimática, la capacidad de los factores de transcripción de unirse a moléculas de ADN y su susceptibilidad a la degradación proteolítica<sup>69,70</sup>. Otra consecuencia derivada del exceso de producción de oxidantes en los tejidos es su capacidad de reaccio-

nar con los ácidos poliinsaturados de las membranas celulares, con la consiguiente formación de aldehídos tóxicos. Tanto la determinación de proteínas oxidadas como la cuantificación de los productos derivados de la peroxidación lipídica son índices que permiten detectar el exceso de producción de oxidantes en un tejido determinado. Por otro lado, también es posible conocer el estado de los sistemas antioxidantes celulares, mediante la determinación de los valores de SOD, catalasa, o de las concentraciones de glutatión, en sus dos fracciones, total y oxidada. El estado de oxidación-reducción de un tejido en unas determinadas condiciones vendrá determinado por el equilibrio existente entre los índices de oxidación y los sistemas antioxidantes celulares.

Algunas observaciones recientes procedentes de nuestro laboratorio, todavía no publicadas, han puesto de manifiesto la presencia significativa de proteínas oxidadas de diversos pesos moleculares aparentes de localización preferente en los compartimientos de membrana y miofibrilar de diafragmas sépticos de ratas. También evidenciamos la presencia del fenómeno de peroxidación lipídica en los músculos sépticos, sin una clara diferencia respecto de los músculos control. Por último, también hemos observado una reducción en los valores de glutatión muscular total en respuesta a la sepsis, acompañada de un incremento en los valores de la fracción oxidada. Los futuros estudios al respecto deberían permitir la identificación de las moléculas afectadas por los fenómenos de oxidación.

### Hemooxigenasa

#### Descripción

La hemooxigenasa (HO) es la enzima limitante de la reacción inicial en la degradación del grupo hemo y fue originariamente identificada por Tenhunen et al<sup>71</sup>. La HO cataliza oxidativamente el grupo hemo para dar cantidades equimolares de biliverdina, monóxido de carbono y hierro libre<sup>72</sup>. La biliverdina se convierte en bilirrubina mediante la acción de la biliverdina reductasa. El hierro libre se incorpora inmediatamente a la ferritina. Tres isoformas identificadas hasta ahora (HO-1, HO-2 y HO-3) catalizan esta reacción<sup>73-75</sup>. La isoforma HO-1 puede también inducirse por otras moléculas no hemo, como el NO<sup>76,77</sup>, las citocinas<sup>78</sup>, los metales pesados<sup>79</sup>, la endotoxina<sup>80,81</sup>, la hiperoxia<sup>82</sup> y otras más, a pesar de que el grupo hemo es el inductor más típico. La isoforma HO-2 se sintetiza constitutivamente, predominando en el sistema nervioso central y el tejido testicular<sup>83</sup>, si bien está presente en otros tejidos, como el músculo esquelético<sup>84</sup>. Mucho más recientemente se ha descrito la existencia de la isoforma HO-3 en órganos como el bazo, el hígado, el timo, la próstata, el riñón, el cerebro y los testes<sup>75</sup>, con muy escasa actividad catalítica comparado a la de las otras dos isoformas. Estas tres isoformas de HO regulan la homeostasis celular mediante los tres productos fruto de su catálisis enzimática: el monóxido de carbono, la bilirrubina y la ferritina, si bien todavía no se han identificado claramente las funciones citoprotectivas de cada molécula.

*Inducción de HO-1 en el músculo esquelético*

Recientemente se ha demostrado que las contracciones musculares repetidas inducen incrementos de ARNm de HO-1 en el músculo de las extremidades de la rata<sup>85</sup>, lo que sugiere un mecanismo antioxidante subyacente en respuesta a valores elevados de ROS generados durante contracciones musculares intensas. En otro estudio se demostró que la expresión inducida de HO-1 tras la administración de hemina sistémica se correlacionó con el contenido de fibras rojas y de mioglobina tisular en diferentes músculos de la rata<sup>86</sup>. Más concretamente, los autores de dicho estudio concluyeron que la expresión de HO-1 sigue un patrón específico de distribución atendiendo al tipo de fibra muscular, dado que su presencia es mayor en los músculos con predominio en fibras tipo I, como el sóleo.

Por último, recientemente se ha descrito la expresión de HO-2 en células satélite, vasculares endoteliales, fibroblastos y miofibras extrafusales del músculo esquelético<sup>84</sup>.

*Inducción de HO en la sepsis*

Uno de los estudios más interesantes ha sido el trabajo de Otterbein et al<sup>87</sup>, en el que se demostró un incremento en los valores de ARNm de HO-1, así como de su actividad enzimática en los pulmones de ratas endotoxémicas. El pretratamiento de estos animales de experimentación con hemoglobina indujo incrementos de la expresión de HO-1, que propiciaron un 100% de supervivencia de los animales. Contrariamente, la administración de un inhibidor competitivo de las HO abrogó completamente los efectos protectores atribuibles a la inducción de HO-1 en las ratas endotoxémicas.

Más recientemente, se ha publicado otro estudio en el que se demuestra que las HO ejercen un efecto protector en la disfunción contráctil del diafragma inducida por la sepsis en ratas<sup>88</sup>. El bloqueo de la actividad de HO, mediante el uso de inhibidor competitivo específico, deterioró todavía más la contractilidad diafragmática en respuesta a la sepsis. Por el contrario, el uso de un agente inductor de la expresión de las HO la mejoró significativamente. Datos recientes procedentes de nuestro laboratorio han confirmado también estos hallazgos (observaciones no publicadas).

**Conclusiones**

En este artículo se han enumerado y descrito los diferentes mecanismos que participan en el proceso de disfunción del músculo esquelético y, más concretamente, de los músculos ventilatorios, que en última instancia podría conllevar el fracaso de la bomba ventilatoria en la sepsis. La importancia de profundizar en el conocimiento de las fuentes responsables de la producción de estos factores, así como de su regulación e interacciones, radica principalmente en dos hechos. Por un lado, la sepsis es una enfermedad que representa hoy en día una de las primeras causas de muerte en las unidades de cuidados intensivos. Además, la insuficiencia respirato-

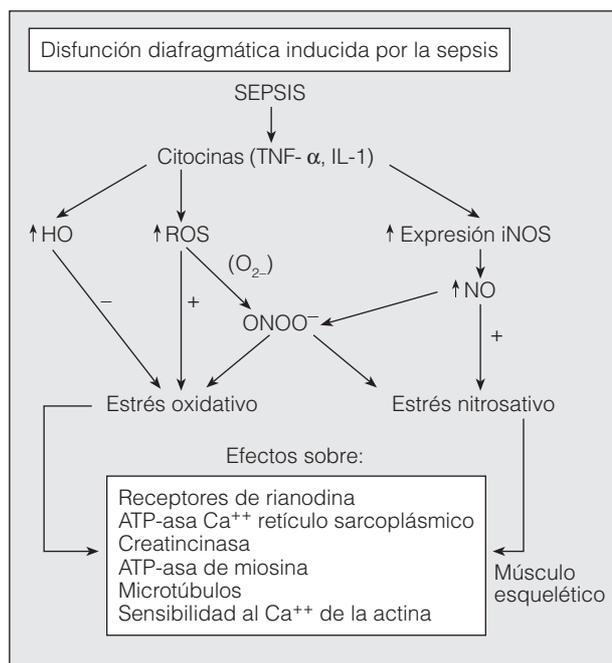


Fig. 6. Esquema resumen de cómo la sepsis conduce a un estado de estrés oxidativo y nitrosativo celular. La sepsis conduciría a un incremento de la producción de citocinas inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) y la interleucina 1 (IL-1), que a su vez dan lugar, por un lado, a la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO), con la consiguiente formación de peroxinitrito (ONOO⁻); por otro, conducirían a un incremento en la expresión de hemooxigenasas (HO).

ria constituye uno de sus principales motivos. Por otro lado, actualmente existe evidencia suficiente de que la inflamación de los músculos ventilatorios y su consiguiente disfunción son los principales responsables del mal funcionamiento de la bomba ventilatoria. Esta disfunción muscular puede conducir a la muerte de los pacientes con una enfermedad séptica.

En la figura 6 se esquematizan los fenómenos descritos en esta revisión. Brevemente, la enfermedad séptica conllevaría la producción de citocinas inflamatorias, que a su vez darían lugar a la producción excesiva de ROS y de NO procedente, sobre todo, de la iNOS. La consecuencia de la excesiva liberación de ambos tipos de moléculas comportaría un estado de estrés oxidativo por un lado, y nitrosativo por otro. Ambos estados metabólicos celulares condicionarían alteraciones en las propiedades contráctiles del músculo esquelético, mediante sus influencias sobre distintas estructuras de la fibra muscular, esenciales para la contracción del músculo. Simultáneamente, se inducirían sistemas protectores celulares, como las HO, con la finalidad de contrarrestar los efectos deletéreos de las ROS y aliviar la disfunción muscular contráctil presente en la sepsis.

Por último, cabe mencionar que el mayor conocimiento de los mecanismos moleculares y sus interacciones, en lo que respecta al mal funcionamiento del músculo en la sepsis, puede tener importantes implicaciones clínicas. El diseño y ulterior establecimiento de estrategias terapéuticas destinadas a la mejoría de las propiedades contráctiles del músculo esquelético, entre ellos

los músculos ventilatorios, constituye la finalidad principal de esta línea de investigación. En este sentido, el desarrollo de enfoques terapéuticos destinados al incremento de la expresión y la actividad de las HO aparece como uno de los caminos más esperanzadores para el tratamiento del fracaso de la bomba ventilatoria en la sepsis.

### Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración del Dr. J Gea en esta revisión, de la Sra. Roser Pedreny por su asistencia editorial, así como del Sr. Luigi Franchi por su asistencia técnica en numerosos experimentos. La Dra. E Barreiro ha recibido diversas ayudas procedentes de SEPAR, FUCAP y SOCAP (España), Biomed (UE) y del Montreal Chest Hospital (McGill University, Canadá) a lo largo de su estancia en Montreal (Canadá) para investigar sobre el estado de óxido-reducción del músculo esquelético en las enfermedades respiratorias.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Farkas G, Cerny F, Rochester DF. Contractility of the ventilatory pump muscles. *Med Sci Sports Exerc* 1996;28:1106-14.
2. Fenn O. A comparison of respiratory and skeletal muscles. En: Cori CF, Foglia VG, Leloir L, Ochoa S, editors. *Perspectives in Biology*. Houssay Memorial Papers. Amsterdam: Elsevier Science BV, 1963.
3. Sharp JT. Respiratory muscles: a review of old and new concepts. *Lung* 1980;157:185-99.
4. De Troyer A. Mechanical action of the abdominal muscles. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1983;19:575-81.
5. Parrillo JE. Shock syndromes related to sepsis. En: Goldman L, Krevans J, Bennet JC, editors. *Cecil Textbook of Medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000; p. 507-12.
6. Burke JF, Pontoppidan H, Welch CE. High output respiratory failure. *Ann Surg* 1963;158:581-94.
7. Cohen CA, Zagalbaum G, Gross D, Roussos C, Macklem PT. Clinical manifestations of inspiratory muscle fatigue. *Am J Med* 1982;73:308-16.
8. Friman G. Effects of acute infectious disease on isometric strength. *Scand J Clin Lab Invest* 1977;37:303-8.
9. Hussain SNA, Simkus G, Roussos C. Respiratory muscle fatigue: a cause of ventilatory failure in septic shock. *J Appl Physiol* 1985; 58:2033-40.
10. Leon A, Boczkowski J, Dureuil B, Desmots JM, Aubier M. Effects of endotoxic shock on diaphragmatic function in mechanically ventilated rats. *J Appl Physiol* 1992;72:1466-72.
11. Boczkowski J, Dureuil B, Pariente R, Aubier M. Preventive effects of indomethacin on diaphragmatic contractile alterations in endotoxemic rats. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:193-8.
12. Shindoh C, DiMarco A, Nethery D, Supinski G. Effect of PEG-superoxide dismutase on the diaphragmatic response to endotoxin. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:1350-4.
13. Krause KM, Moody MR, Andrade FH, Addison AT, Miller CC III, Kobzik L, et al. Peritonitis causes diaphragm weakness in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1277-82.
14. Hussain SNA. Respiratory muscle dysfunction in sepsis. *Mol Cell Biochem* 1998;179:125-34.
15. Hussain SNA, Roussos C, Magder S. Autoregulation of diaphragmatic blood flow in dogs. *J Appl Physiol* 1988;64:329-36.
16. Hussain SNA, Graham R, Rutledge F, Roussos C. Respiratory muscle energetics during endotoxic shock in dogs. *J Appl Physiol* 1986;60:486-93.
17. Diaz PT, Julian MW, Wewers M, Clanton TL. Tumor necrosis factor and endotoxin do not directly affect in vitro diaphragm function. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:281.
18. Murphy TD, Gibson R, Staendert TA, Woodrum DE. Diaphragmatic failure during group streptococcal sepsis in piglets: the role of thromboxane A2. *J Appl Physiol* 1995;78:491-8.

19. Wilcox PG, Wakai Y, Walley KR, Cooper DJ, Road J. Tumor necrosis factor (decreases in vivo diaphragm contractility in dogs. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:1368-73.
20. Shindoh C, Hida W, Ohkawara Y, Yamauchi K, Ohno I, Takishima T, et al. TNF- $\alpha$  mRNA expression in diaphragm muscle after endotoxin administration. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:1690-6.
21. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-42.
22. Gaston B, Drazen JM, Loscalzo J, Stamler JS. The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:538-51.
23. Fang FC. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest* 1997;100:S43-S50.
24. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 1996; 271:C1424-C37.
25. Goretski J, Hollocher TC. Trapping of nitric oxide produced during denitrication by extracellular hemoglobin. *J Biol Chem* 1988;263:2316-23.
26. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994;298:249-58.
27. Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 1994;372:546-8.
28. Fujii Y, Guo Y, Hussain SNA. Regulation of nitric oxide production in response to skeletal muscle activation. *J Appl Physiol* 1998;85:2330-6.
29. El Dwari Q, Comtois A, Guo Y, Hussain SNA. Endotoxin-induced skeletal muscle contractile dysfunction: contribution of nitric oxide synthases. *Am J Physiol* 1998;274:C770-C9.
30. Comtois AS, Barreiro E, Huang PL, Marette A, Perrault M, Hussain SNA. Lipopolysaccharide-induced diaphragmatic contractile dysfunction and sarcolemmal injury in mice lacking the neuronal nitric oxide synthase. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:977-82.
31. Kobzik L, Stringer B, Balligand JL, Reid MB, Stamler JS. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 211:375-81.
32. Hussain SNA, Giaid A, El Dwari Q, Sakkal D, Hattori R, Guo Y. Expression of nitric oxide synthases and GTP cyclohydrolase I in the ventilatory and limb muscles during endotoxemia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17:173-80.
33. El Dwari Q, Comtois A, Guo Y, Hussain SNA. Endotoxin-induced skeletal muscle contractile dysfunction: contribution of nitric oxide synthases. *Am J Physiol* 1998;274:C770-C9.
34. Boczkowski J, Lanone S, Ungureanu-Longrois D, Danelou G, Fournier T, Aubier M. Induction of diaphragmatic nitric oxide synthase after endotoxin administration in rats. *J Clin Invest* 1996; 98:1550-9.
35. Thompson M, Becker L, Bryant D, Williams G, Levin D, Margraf L, Giroir BP. Expression of the inducible nitric oxide synthase gene in diaphragm and skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1996; 81:2415-20.
36. Gath I, Closs EI, Godtel-Armbrust U, Schmitt S, Nakane M, Wessler I, Forstermann U. Inducible NO synthase II and neuronal NO synthase I are constitutively expressed in different structures of guinea pig skeletal muscle: implications for contractile function. *FASEB J* 1996;10:1614-20.
37. Comtois AS, El Dwari Q, Laubach V, Hussain SNA. Lipopolysaccharide-induced diaphragmatic contractile dysfunction in mice lacking the inducible nitric oxide synthase. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1975-80.
38. Stamler JS, Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev* 2001;81:209-37.
39. Van der Vliet A, Eiserich JP, Shigenaga MK, Cross CE. Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1-9.
40. Beckman JS. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* 1996;9:836-44.
41. Rubbo H, Darley-Usmar V, Freeman BA. Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. *Chem Res Toxicol* 1996;9:809-20.
42. Tamir S, Burney S, Tannenbaum SR. DNA damage by nitric oxide. *Chem Res Toxicol* 1996;9:821-7.
43. Ischiropoulos H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 1998;356:1-11.

44. MacMillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Beckman JS. Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic jection of human renal allografts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:11853-8.
45. Crow JP, Ye YZ, Kirk M, Barnes S, Beckman JS. Superoxide dismutase catalyzes nitration of tyrosines by peroxynitrite in the rod and head domains of neurofilament-L. *J Neurochem* 1997; 69: 1945-53.
46. Boota A, Zar H, Kim YM, Johnson B, Pitt B, Davies P. IL-1 beta stimulates superoxide and delayed peroxynitrite production by pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1996; 271:L932-L8.
47. Eiserich JP, Estévez AG, Bamberg T, Ye YZ, Chumley PH, Beckman JS, et al. Microtubule dysfunction by post-translational nitrotyrosination of  $\alpha$ -tubulin: a nitric oxide-dependent mechanism of cellular injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6365-70.
48. Moreno JJ, Pryor WA. Inactivation of a1-proteinase inhibitor by peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* 1991;5:425-31.
49. Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADPH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 1980;191:421-7.
50. Supinski G. Free radical induced respiratory muscle dysfunction. *Mol Cell Biochem* 1998;179:99-110.
51. Davies KJA, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer LJ. Free radical and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Comm* 1982;107:1198-205.
52. Gohil K, Rothfuss L, Lang J, Packer L. Effect of exercise training on tissue vitamin E and ubiquinone content. *J Appl Physiol* 1987; 63:1638-41.
53. Parks DA, Granger DN. Ischemia-induced vascular changes: Role xanthine oxidase and hydroxyl radicals. *Am J Physiol* 1983; 245:G285-G9.
54. Javesghani D, Magder S, Barreiro E, Quinn MT, Hussain SNA. Production of superoxide anions by the NAD(P)H oxidase in mammalian skeletal muscles [en prensa]. *Am J Respir Crit Care Med*.
55. Kontos HA. Oxygen radicals in cerebral vascular injury. *Cir Res* 1985;57:508-16.
56. Jackson MJ, Edwards RH. Free radicals and trials of antioxidant therapy in muscle diseases. *Adv Exp Med Biol* 1990;264:485-91.
57. Reid MB, Haack KE, Franchek KM, Valberg PA, Kobzik L, West MS. Reactive oxygen in skeletal muscle: I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J Appl Physiol* 1992;73:1797-804.
58. Reid MB. Muscle fatigue: mechanisms and regulation. En: Seck CK, Packer L, Hannine O, editors. *Exercise and oxygen Toxicity*, 2nd ed. Amsterdam: Elsevier Science BV, 1998.
59. Reid MB, Shoji T, Moody MR, Entman ML. Reactive oxygen in skeletal muscle (II). Extracellular release of free radicals. *J Appl Physiol* 1992;73:1805-9.
60. Reid MB, Khawli FA, Moody MR. Reactive oxygen in skeletal muscle.III. Contractility of unfatigued muscles. *J Appl Physiol* 1993;75:1081-7.
61. Khawli F, Reid MB. N-acetylcysteine depresses contractile function and inhibits fatigue of diaphragm in vitro. *J Appl Physiol* 1994;77:317-24.
62. Andrade FH, Reid MB, Allen DG, Westerblad H. Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibers from mouse. *J Physiol* 1998;509:565-75.
63. Supinski G, Nethery D, DiMarco A. Effect of free radical scavengers on endotoxin-induced respiratory muscle dysfunction. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:1318-24.
64. Peralta JG, Llesuy S, Evelson P, Carreras MC, González B, Poderoso JJ. Oxidative stress in skeletal muscle during sepsis in rats. *Cir Shock* 1993;39:153-9.
65. Llesuy S, Evelson P, González B, Peralta JG, Carreras MC, Poderoso JJ, et al. Oxidative stress in muscle and liver of rats with septic syndrome. *Free Radic Biol Med* 1994;16:445-51.
66. Supinski G, Nethery D, Stofan D, DiMarco A. Comparison of the effects of endotoxin on limb, respiratory, and cardiac muscles. *J Appl Physiol* 1996;81:1370-8.
67. Callahan LA, Stofan D, Szweda LI, Nethery D, Supinski G. Free radicals alter maximal diaphragmatic mitochondrial oxygen consumption in endotoxin-induced sepsis. *Free Radic Biol Med* 2001; 30:129-38.
68. Callahan LA, Nethery D, Stofan D, DiMarco A, Supinski G. Free radical-induced contractile protein dysfunction in endotoxin-induced sepsis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24:210-7.
69. Davies KJA. Protein damage and degradation by oxygen radicals. *J Biol Chem* 1987;262:9895-901.
70. Wolf SP, Dean RT. Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis. *Biochem J* 1986;234: 399-403.
71. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968;61:748-55.
72. Choi AMK, Alam J. Heme oxygenase-1: Function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;15:9-19.
73. Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms and clinical implications. *FASEB J* 1988;2:2557-68.
74. McCoubrey WK, Ewing JF, Maines MD. Human heme oxygenase-2: characterization and expression of a full-length cDNA and evidence suggesting that the two HO-2 transcripts may differ by choice of polyadenylation signal. *Arch Biochem Biophys* 1992; 295:13-20.
75. McCoubrey WK, Huang TJ, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 1997;247:725-32.
76. Datta PK, Lianos EA. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression in mesangial cells. *Kidney Int* 1999;55:1734-9.
77. Polte T, Abate A, Dennery PA, Schroder H. Heme-oxygenase-1 is a cGMP-inducible endothelial protein and mediates the cytoprotective action of nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1209-15.
78. Terry CM, Clikeman JA, Hoidal JR, Callahan KS. Effect of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\alpha$  on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1998;274:H883-H91.
79. Eysen-Hernández R, Ladoux A, Frelin C. Differential regulation of cardiac heme-oxygenase and vacular endothelial growth factor mRNA expressions by hemin, heavy metals, heat shock, and anoxia. *FEBS Lett* 1996;382:229-33.
80. Carraway MS, Ghio AJ, Taylor JL, Piantadosi CA. Induction of ferritin and heme-oxygenase-1 by endotoxin in the lung. *Am J Physiol* 1998;275:L583-L92.
81. Camhi SL, Alam J, Wiegand GW, Chin BY, Choi AMK. Transcriptional activation of the HO-1 gene by lipopolysaccharide is mediated by 5' distal enhancers: role of reactive oxygen intermediates and AP-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;18:226-34.
82. Lee PJ, Alam J, Sylvester SL, Inamdar N, Otterbein L, Choi AMK. Regulation of heme-oxygenase-1 expression in vivo and in vitro in hyperoxic lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 14:556-68.
83. Otterbein LE, Choi AMK. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol* 2000; 279: L1029-L1037.
84. Baum O, Feussner M, Richter H, Gossrau R. Heme-oxygenase-2 is present in the sarcolemma region of skeletal muscle fibers and is non-continuously co-localized with nitric oxide synthase-1. *Acta Histochem* 2000;102:281-98.
85. Essig DA, Borger DR, Jackson DA. Induction of heme-oxygenase-1 (HSP32) mRNA in skeletal muscle following contractions. *Am J Physiol* 1997;272:C59-C67.
86. Vesely MJ, Sanders R, Green CJ, Motterlini R. Fibre type of haem oxygenase-1 induction in rat skeletal muscle. *FEBS Lett* 1999;458:257-60.
87. Otterbein L, Sylvester SL, Choi AMK. Hemoglobin provides protection against lethal endotoxemia in rats: the role of heme oxygenase-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13:595-601.
88. Taillé C, Foresti R, Lanone S, Zedda C, Green C, Aubier M, et al. Protective role of heme oxygenases against endotoxin-induced diaphragmatic dysfunction in rats. *Am J Crit Care Med* 2001; 163:753-61.