

Valor diagnóstico de las miosinas séricas en las lesiones musculares

BALIUS R.⁽¹⁾, ESTRUCH A.^{(1) (2)},
GUERRERO M.⁽²⁾, CADEFAU J.A.⁽²⁾,
PARRA J.⁽²⁾, RODAS G.⁽¹⁾, CUSSÓ R.⁽²⁾

1. Centro de Estudios de Alto Rendimiento (CEARE, Generalitat de Catalunya) Barcelona. ESPAÑA.

2. Departamento de Ciencias Fisiológicas I, Facultad de Medicina, IDIBAPS. Universidad de Barcelona.

CORRESPONDENCIA:

Roser Cussó

Unitat de Bioquímica. Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

C/ Casanova 143

Barcelona 08036

e-mail: mcusso@ub.edu

APUNTS. MEDICINA DE L'ESPORT. 2005; 146: 25-30

RESUMEN: El diagnóstico de las lesiones musculares que sufren los deportistas se realiza mediante un diagnóstico clínico acompañado de pruebas de confirmación por técnicas de imagen de la lesión (ecografía y/o resonancia magnética nuclear) y técnicas de laboratorio por análisis de sangre que detectan la presencia de marcadores séricos inespecíficos de lesiones musculares.

Las pruebas por imagen han demostrado ser excelentes para la detección y confirmación de las lesiones de Grado II y III. Sin embargo las lesiones de Grado I quedan en muchas ocasiones sin confirmación por estas técnicas. Los marcadores séricos tradicionales se comportan de forma parecida, siendo todos ellos no específicos del músculo esquelético.

La valoración de las miosinas rápida y lenta en sangre después de 48 horas de producirse la lesión ha demostrado ser un buen parámetro para la detección de las lesiones tipo I especialmente, basándose en el hecho de que la miosina rápida es un marcador exclusivo del músculo esquelético.

El diagnóstico correcto de las lesiones Grado I puede facilitar la prevención de la progresión de la lesión en deportista sometidos a entrenamientos y competiciones continuadas, pudiendo ayudar al médico deportivo en sus decisiones.

PALABRAS CLAVE: Lesiones, músculo, diagnóstico, miosina.

SUMMARY: The diagnosis of the muscular injuries sportsmen suffer is carried out through a clinical diagnosis together with confirmation tests through imaging techniques (echography and/or nuclear magnetic resonance) and laboratory techniques through blood testing that detect the presence of non-specific serum markers of muscular injuries.

Imaging tests turned out to be excellent for the detection and confirmation of injuries of second- and third-degree. However, first-degree injuries remain, many times, without confirmation through these techniques. The traditional serum markers behave in a similar way, all of them being non-specific of the skeletal muscle. The evaluation of the fast and slow myosin in blood 48 hours after the injury turned out to be a good parameter for the detection of especially type I injuries, since fast myosin is an exclusive marker of the skeletal muscle.

The correct diagnosis of first-degree injuries can facilitate the prevention of the injury's progression in sportsmen subjected to continued training and competitions. It can also help the sports doctor to make his decisions.

KEY WORDS: Injury, muscle, diagnosis, myosin.

INTRODUCCION

El músculo es sensible a los protocolos de contracción y trabajo a los que se ve sometido, ya que su estructura está preparada para soportarlos y adaptarse a nuevas situaciones de esfuerzo. Sin embargo, su integridad se halla afectada, en mayor o menor medida, por el sobreesfuerzo, produciéndose roturas que denominamos lesiones musculares. Dichas lesiones pueden producir en mayor o menor grado, incapacidad para continuar el esfuerzo.

Un ejercicio extenuante no habitual provoca lesiones pasajeras en las estructuras del músculo esquelético. Está bien documentado que el ejercicio que incluye acciones musculares excéntricas provoca cambios directos más severos desde un punto de vista histopatológico y bioquímico^(12,18) y síntomas indirectos de lesión muscular⁽⁹⁾ que en el caso de ejercicio concéntrico.

Ejercicios excéntricos de mucha fuerza conducen a lesiones musculares con cambios significativos en la estructura muscular y en su función. Se inducen cambios en las membranas de las fibras musculares⁽¹⁴⁾ y en el citoesqueleto caracterizados por cambios morfológicos tales como rotura miofibrilar y de la línea Z del sarcómero a nivel celular^(3, 9) y vacuolización del retículo sarcoplásmico.

Para poder detectar estas lesiones se han diseñado tecnologías específicas mediante métodos directos e indirectos. Como métodos directo existen las biopsias musculares que pueden aportar información tanto de los componentes como de la estructura del músculo (análisis metabólicos e histológicos). Entre los métodos indirectos se encuentran los instrumentos que permiten valorar las características del músculo sin dañarlo, como son la resonancia magnética nuclear (RM), la ecografía y la electromiografía. Dentro de este grupo se hallan también los marcadores séricos de lesión muscular, entre los cuales se hallan aspartato aminotransferasa (AST), alanina amino transferasa (ALT), lactato deshidrogenasa (LDH), creatina quinasa (CK), mioglobina (Mb), proteína de transporte de ácidos grasos de corazón (H-FABP), anhidrasa carbónica III y las proteínas contráctiles troponinas y miosinas (MHC)⁽¹⁸⁾.

Soricher y col.,⁽¹⁸⁾ expuso la necesidad de disponer de marcadores séricos ideales de lesión de fibra muscular esquelética. Un requerimiento es que el marcador sea absolutamente específico de las fibras musculares para permitir un diagnóstico seguro de la lesión muscular. Ninguno de los marcadores analizados habitualmente lo son.

El músculo esquelético es un tejido con una heterogeneidad en el tipo de fibras. Está formado por múltiples tipos de fibras⁽¹⁵⁾ aunque se pueden agrupar en fibras de tipo I y II

(IIa y IIb), la proporción de las cuales varía con el tipo de músculo e incluso dentro de las diferentes regiones del mismo⁽¹³⁾. Aunque la proporción entre ambos tipos de fibras no es fácil de modificar, dependiendo del tipo de ejercicio que se realiza, hay ligeros cambios entre las de tipo I, fibras aeróbicas y muy resistentes a la fatiga y las de tipo II, más anaeróbicas y menos resistentes a la fatiga⁽⁶⁾. Existen diversas formas de caracterizar el tipo de fibras. Se pueden caracterizar mediante tinciones histoquímicas (por su contenido en moléculas o enzimas característicos de los metabolismos más aeróbicos o anaeróbicos) o mediante su contenido proteico. Algunas de las proteínas contráctiles presentan isoformas diferentes según el tipo de fibra. Una de ellas es la miosina, que puede presentar cadenas pesadas y ligeras diferentes según el tipo de fibra sea rápida o lenta.

La miosina, una de las proteínas más importantes del aparato contráctil, existe en múltiples isoformas, lo cual contribuye a la diversidad funcional de las fibras musculares. Las mayores diferencias funcionales de las isoformas de la miosina reside en una porción de la cadena pesada).

Los marcadores usados habitualmente tales como CK, H-FABB, Mb, TnI además de no ser totalmente específicos para el músculo esquelético, alcanzan un valor máximo antes de las 10 horas posteriores al origen de la lesión y descienden considerablemente antes de llegar a las 24 horas después de la situación estresante. La mayoría de lesiones se producen en días festivos, con lo cual es muy fácil que pasen estas 10-12 horas críticas para efectuar el análisis del paciente. A menudo las lesiones recién producidas no van acompañadas de dolor y un día más tarde puede ser suficiente para que los marcadores de bajo peso molecular ya se hayan degradado y no se encuentre rastro en el suero. Las troponinas son proteínas muy específicas del tipo de fibra, de bajo peso molecular pero son susceptibles de ser rápidamente proteolizadas, pudiendo ser la razón de que tengan una vida media muy corta en sangre.

La miosina presenta un perfil ideal como parámetro a estudiar y es asignable directamente al grado de lesión, ya que debido a su elevado peso molecular su aparición en sangre solo se puede explicar por una lesión profunda de la fibra. La miosina rápida es característica únicamente del músculo esquelético rápido, mientras que la lenta es común únicamente a los músculos esquelético y cardíaco. El valor máximo de la miosina lenta en sangre ha sido medido por Schiaffino y Reggiani⁽¹⁶⁾ y presenta su máximo después de 48 y 72 horas de la lesión.

El objetivo del presente trabajo es valorar las lesiones musculares utilizando como marcadores las miosinas rápidas

y lentas presentes en el suero de deportistas después de 48 horas de haber sufrido una lesión. Se comparará la eficacia de este marcador con la detección de la lesión por ecografía, RM y otros marcadores séricos tradicionales.

MÉTODOS

Materiales: Anticuerpos monoclonales anti-miosina (músculo esquelético rápido) clon My-32 (Sigma), anticuerpos monoclonales anti-miosina (músculo esquelético lento) clon NOQ7.5.4D (Sigma). Protein A-agarose (Sigma).

Participantes: 42 atletas jóvenes, de edades comprendidas entre 18 y 25 años, practicando atletismo, hockey, tenis, fútbol y pentatlón participaron en el estudio después de sufrir dolores y/o lesiones. Los controles fueron jóvenes sedentarios de la misma edad. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad de Barcelona y del Hospital Clínico y Provincial de Barcelona.

Las lesiones musculares fueron clasificadas en tres grados, de acuerdo con el tipo de hallazgo clínico. Grado I (agujetas y alargamiento muscular, desgarro muscular mínimo). Grado II (rotura fibrilar y desgarro muscular moderado). Grado III (rotura de fibras y desgarro muscular evidente).

Se practicó una extracción de 2 ml de sangre de los individuos controles y de los atletas, 48 horas después de haber sufrido algún problema muscular.

Tratamiento de la muestra: Los 2 ml de sangre se recogieron en un tubo Vacutainer. La sangre fue centrifugada y el suero fue concentrado con proteína A-agarosa por inmunoprecipitación. La solución fue mezclada con PBS, proteína A-agarosa y anticuerpos anti-miosina rápida y lenta. Se incubó a 37°C, se centrifugó a 5000xg y el precipitado se resuspendió en el tampón de carga de la electroforesis. La muestra se colocó en un gel de poliacrilamida para la detección por western blot. Las bandas electroforéticas obtenidas fueron detectadas con Ultra-Supersignal e Hyperfilm TM ECL.

La cuantificación fue hecha por densitometría 5200C y los datos tratados con el programa Quantity One 1-D (Bio-Rad) en un Hewlett Packard Scanjet 5200C.

Valoración de actividades enzimáticas

Creatina quinasa (CK), lactato deshidrogenasa (LDH), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) fueron determinadas con el autoanalizador Technicon DAX System, Clinical Method, Bayer Publication nº SM4-

1140L95 (1995). CK de acuerdo con el método de Szasz y col.,⁽¹⁹⁾ LDH con el método de Bass y col.⁽²⁾, ASAT según el de Bergmeyer y col.⁽⁴⁾ y ALAT según el de Wroblewski y col.⁽²⁰⁾. Mioglobina (Mb) por el método RIA automatizado de Mallinckrod (Diagnostica, Dietzenbach, Alemania) y las proteínas por el método de Bradford⁽⁵⁾.

Valoración por imágenes

La ecografías fueron realizadas en el CEARE y en el Departamento de ecografías de la Clínica FIATC. Se utilizaron aparatos de ultrasonografía con sonda multifrecuencia de Toshiba Medical Sistem (Just-Vision en CEARE, PowerVision en FIATC).

Las Resonancias Magnéticas Nucleares (RM) fueron realizadas en el Departamento de Resonancia Magnética de la Clínica Corachán, utilizando un aparato Siemens Symphony 1.5 TESS.

Ambos tipos de pruebas obtienen resultados tanto más evidentes cuanto mayor es la lesión. Así, en las lesiones de Grado I, la ecografía suele objetivar lesión (sufusión hemática y defecto de algunas fibras) transcurridos dos o tres días del accidente, mientras que la RM muestra desde el primer momento edema muscular. Las lesiones de Grado II muestran edema y defecto fibrilar tanto por ecografía como por RM y las de Grado III objetivan un defecto mayor asociado a hematoma y edema muscular. Tanto la ecografía como la RM sirven para control evolutivo de la lesión, observando cómo se va el edema y aparece la reparación fibrilar.

RESULTADOS

I. Imágenes por RM

En la Figura 1 se muestran tres imágenes por resonancia magnética nuclear de distintos grados de lesión muscular. 1A): Lesión de Grado I en tercio superior de la cara posterior del muslo derecho. Observamos, en corte axial, zona de edema muscular (aumento de señal) que traduce lesión reciente en bíceps femoris (flechas). 1B): Lesión de Grado II en tercio medio-distal de la cara posterior del muslo izquierdo. Observamos, en corte axial, zona de edema (aumento de señal) y defecto fibrilar que traduce lesión reciente en bíceps femoris (cabeza larga) (flechas). 1C): Lesión Grado III en tercio distal del muslo de la cara anterior. Observamos, en corte coronal, gran zona de edema (aumento de señal) y defecto fibrilar extenso del rectus femoris, en su tercio distal (flechas).

Figura I Resonancias magnéticas nucleares de diferentes grados de lesión muscular:
A) Lesión de Grado I. B) Lesión de Grado II.
C) Lesión de Grado III.

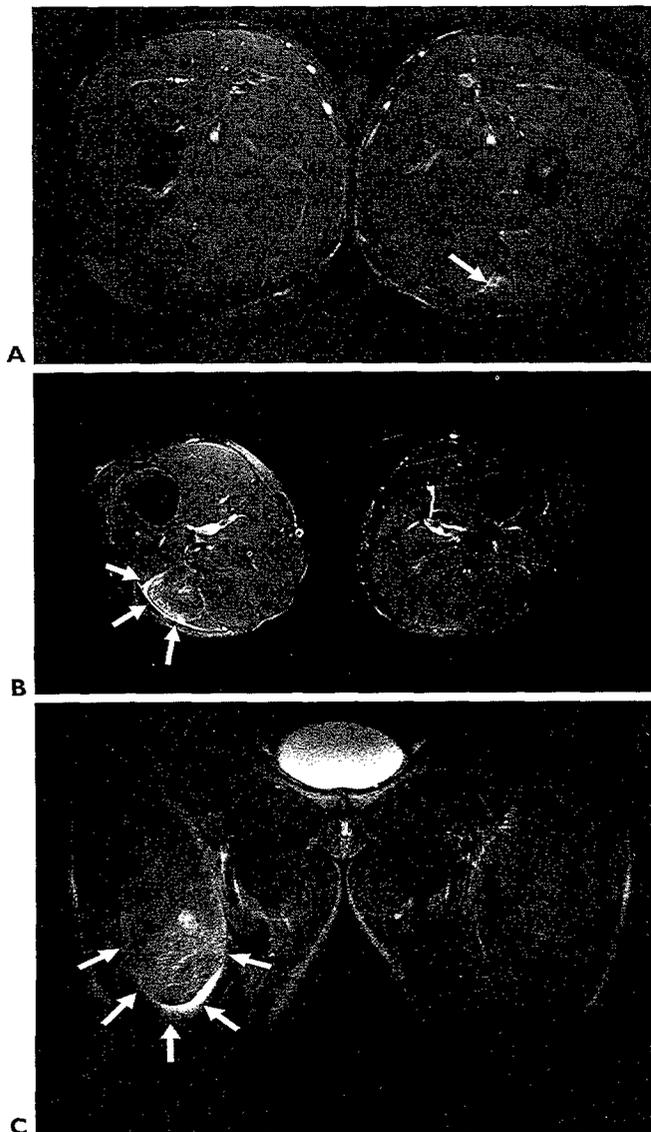
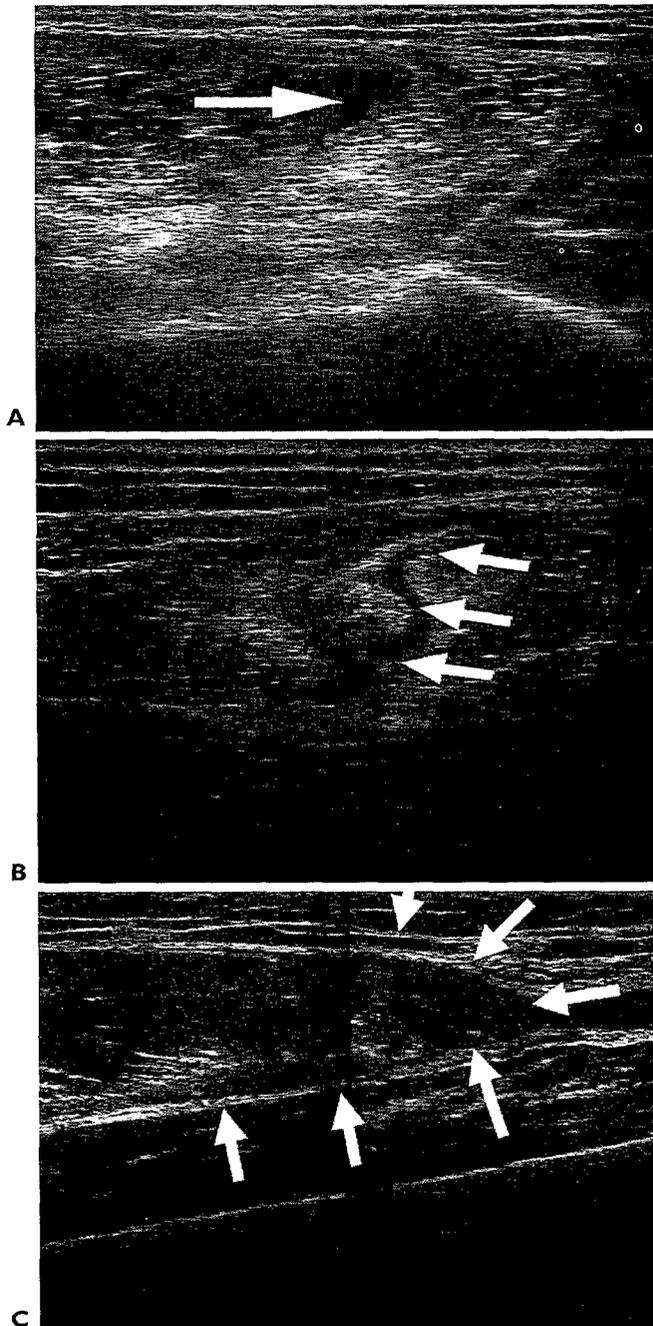


Figura II Ecografías de diferentes grados de lesión muscular:
A) Lesión de Grado I. B) Lesión de Grado II.
C) Lesión de Grado III.



2. Imágenes ecográficas

En la Figura 2 se muestra la correspondencia ecográfica de las lesiones mostradas en la Figura 1. 2A): lesión de Grado I. La ecografía muestra, en corte transversal, zona de defecto fibrilar que se sitúa entre el bíceps femoris y el semitendinoso. 2B): lesión de Grado II. La ecografía muestra, en corte transversal, zona más extensa de defecto fibrilar y sufusión hemática en cabeza larga de bíceps femoris. 2C): lesión de Grado III. La ecografía muestra, en corte longitudinal, defecto muscular completo del rectus femoris (flechas).

3. Diagnóstico clínico, enzimas marcadores y niveles de miosinas en los músculos normales y lesionados

En la Tabla I se observan los valores normales de los sueros de atletas controles y de los atletas con diversos grados de lesiones musculares. Se observa que después de 48 horas de la instauración del problema muscular los marcadores,

Tabla I Comparación de los resultados obtenidos con las diferentes técnicas

Diagnóstico clínico	Número muestras	Ecografía	RM	Mb µg/l	LDH U/l	AST U/l	ALT U/l	CK U/l	MIOSINA µg/l	
									Rápida	Lenta
Normal	9	—	—	<20	<350	<21	<28	<259	<300	<300
Grado I	12	(-) o (+)	—	22±10	303±42	22±3	16±3	202±84	2880±550	1281±683
Grado II	16	++	++	31±18	339±33	25±6	26±13	500±139	3531±659	3772±281
Grado III	5	+++	+++	92±90	393±27	43±29	24±2	735±519	1890±229	4769±249

LDH, AST, ALT, CK y Mb no muestran aumento en las lesiones de Grado I. Solamente la miosina rápida resulta un marcador con valores muy elevados, seguido de la miosina lenta. El resultado de las ecografías y RM en las lesiones de Grado I muestran resultados confusos en algunos casos, dando resultados negativos o positivos que no aseguran el reconocimiento total de la lesión. En las lesiones Grado II y Grado III las técnicas ecográficas y de RM son muy eficaces, ya que detectan las lesiones vía imagen.

En las lesiones de Grado II los marcadores séricos presentan ligeros aumentos solo en CK, siendo los mayores aumentos los de ambos tipos de miosina, que pueden llegar hasta 10 veces sobre su valor normal. Las lesiones de Grado III son bien detectadas por los marcadores CK, y por ambos tipos de miosinas.

DISCUSION

Los diferentes músculos humanos están compuestos por una mezcla de fibras lentas y rápidas próxima al 50%, a diferencia de lo que ocurre en ciertos animales que poseen músculos con un 90% de fibras rápidas únicamente y otros con un 90% de fibras lentas. Concretamente el vastus lateralis de jóvenes atletas entre 15 y 18 años de raza caucásica presentan un 36.5% de fibras de tipo lento y 63.5% de fibras de tipo rápido y de ellas un 52,3% son fibras tipo IIa, 8,1% tipo IIb y 3.1% de tipo IIc.⁽⁶⁾ La existencia de músculos mixtos en humanos hará que las lesiones sean la causa de la salida de miosinas lentas y rápidas a sangre. Sin embargo debido a que la resistencia a las lesiones y a la fatiga de ambos tipos de fibras no es la misma, podrán encontrarse en sangre MCH lentas o rápidas según sea el tipo de fibras lesionadas. En general las fibras rápidas son más fatigables y más sensibles a la lesión. Por ello podemos esperar que las fibras rápidas que se fatiguen más rápidamente den salida a MCH rápida antes que las lentas delante de ejercicios menos intensos. Las MCH lentas se extravasaran en condiciones más fatigantes y probablemente su hallazgo en sangre será la expresión de una lesión más importante.

Por otro lado la presencia de MCH rápida en sangre es señal de afectación única de músculo esquelético por ello constituye un marcador absolutamente específico. La presencia de MHC lenta podría indicar la presencia de lesión muscular en músculo esquelético y/o en corazón. Sin embargo dado el tipo de paciente que se somete al test si son deportistas a los que se descarta una lesión cardiaca, su detección en sangre respondería como un marcador de lesión de fibras lentas, con las consecuencias que este dato pudiera aportar.

Hemos desarrollado un método de detección de miosinas en sangre basado en el reconocimiento específico por anticuerpos anti-miosina rápida y lenta. Hemos estudiado un grupo de deportistas procedentes de deportes diversos, que se presentaron a la consulta médica por dolores musculares. Se les practicó un examen médico, una ecografía, una resonancia magnética y unos análisis de sangre entre los que se valoró la presencia de diversos enzimas que se utilizan como marcadores musculares, y las miosinas lenta y rápida. También fueron estudiados 9 jóvenes de las mismas edades que los atletas pero que no practicaban deporte de manera continuada, solo de forma esporádica y como diversión y que fueron catalogados como normales.

Nuestros resultados indican que en estado normal la concentración de miosina lenta y rápida en sangre no superaba los 300 µg/ml. Los pacientes diagnosticados con lesiones Grado 1, que no son visibles por ecografía y/o por RM, presentaban valores elevados de ambas miosinas aunque las miosinas rápidas eran superiores a las lentas mostrando una relación rápida/lenta superior a 1. Los demás marcadores enzimáticos no se hallaban modificados comparando con los controles. En las lesiones Grado II y III, que ya eran diagnosticadas por ecografía y RM se mostraba un aumento de las miosinas tanto rápidas como lentas, aunque ahora las lentas superaban a las rápidas mostrando una relación rápida/lenta inferior a 1. Cuanto más importante era la lesión más aumentaban la concentración de miosinas lentas respecto a las rápidas. Las CK también mostraron un aumento en

la misma dirección que la lesión muscular creciendo en el mismo sentido que las miosinas lentas, mostrando ser muy buen marcador para las lesiones tipo III especialmente.

Se concluye que la medida de miosina rápida, es un marcador muy sensible para las lesiones de grado I, al menos tanto como la prueba de RM y que más que la ecografía y el diagnóstico clínico. Por otro lado es un marcador totalmente específico del músculo esquelético, propiedad que no comparte ninguno de los marcadores que hoy día se utilizan, tales como CK y mioglobinas. También presenta la ventaja de que es más sensible y más estable en sangre, ya que presenta un máximo a las 48 horas de la lesión y perdura durante más tiempo, con lo cual es más fácil utilizarlo en diagnósticos que no se realizan al momento, y que puede utilizarse como

parámetro para seguir la evolución de la lesión muscular. Por ello concluimos que la determinación de miosinas rápidas y lentas puede ser un buen sistema de ayuda al diagnóstico de las lesiones musculares, especialmente para aquellas que son difícilmente detectables por otros procedimientos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la participación de los voluntarios y la cooperación del CEARE y el IDIBAPS de la Facultad de Medicina. El estudio ha sido financiado principalmente por dos ayudas del Consell Català de l'Esport (Generalitat de Catalunya) y una pequeña colaboración del Consejo Superior de Deportes (MEC).

Bibliografía

1. Armstrong RB, Ogilvi RW, and Schwane JA. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *J.Appl.Physiol.* 436: 735-741, 1983.
2. Bass A, Brdiczk D, Eyer P, Hofer P, and Pette D. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *European Journal Biochemistry* 10: 198-206, 1969.
3. Belcastro AN, Shewchuk LD, and Raj DA. Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis. *Molecular Cellular Biochemistry* 179: 135-145, 1998.
4. Bergmeyer HU, Bowers GN, Horder S, and Moss DW. Provisional recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration. *Clinical Chimica Acta* 70: f19-f42, 1976.
5. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254, 1976.
6. Cadefau JA, Casademont J, Grau JM, Fernandez J, Balaguer A, Vernet M, Cussó R, and Urbano-Márquez A. Biochemical and histochemical adaptation to sprint training in young athletes. *Acta Physiol Scand* 140: 341-351, 1990.
7. Di Lisa E, De Tullio R, Salamino F, Barbatto R, Melloni E, Siliprandi N, Schiaffino S, and Pontremoli S. Specific degradation of troponin T and I by u-calpain and its modulation by substrate phosphorylation. *Biochemical Journal* 308: 57, 1995.
8. Ebbeling CB and Clarkson PM. Exercise-induced muscle damage and adaptation. *Sports Med.* 7: 207-234, 4 A.D.
9. Friden J and Lieber RL. Structural and mechanical bases of exercise-induced muscle injury. *Medicine Science of Sports Exercise* 24: 521-530, 1992.
10. Friden J, Sjostrom M, and Ekblom B. A morphological study of delayed muscle soreness. *Experientia* 37: 506-507, 1981.
11. Friden J, Sjostrom M, and Ekblom B. Myofibrillar damage following intense eccentric exercise in man. *International Journal of Sports Medicine.* 4: 170-176, 1983.
12. Komulainen J and Kytölä J. Vihko V. Running-induced muscle injury and myocellular enzyme release in rats. *J.Appl.Physiol.* 77: 2299-2304, 2004.
13. Lexel J., Henrikson-Larsen K., and Sjostrom M. (1983). *Acta Physiol. Scand.* 117, 115-122.
14. Newman DJ, Jones DA, Ghosh G, and Aurora P. Muscle fatigue and pain after eccentric contractions at long and short length. *Clinical Science* 74: 553-557, 1988.
15. Pette D and Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc.Res. Tech.* 50: 500-509, 2000.
16. Schiaffino S and Reggiani C. Molecular diversity of miofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiology Review* 76: 371-423, 1996.
17. Sorichter S, Mair J, Koller A, Gebert W, Rama C, Calzolari C, Artner-Dworzak E., and Puschendorf B. Skeletal troponin I as a marker of exercise-induced muscle damage. *J.Appl.Physiol.* 83: 1076-1082, 1997.
18. Sorichter S, Puschendorf B, and Mair J. Skeletal muscle injury induced by eccentric muscle action: muscle proteins as markers of muscle fiber injury. *Exercise Immunology Review* 5: 5-21, 1999.
19. Szasz G., Gruber W., and Bernt E. Creatine kinase in serum. I Determination of optimum reaction conditions. *Clin. Chem.* 22, 650-6, 1976.
20. Wroblewski F and Ladue JS. Serum pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 91: 569-571, 1956.