

“El trabajo resistivo de la ventilación induce una disminución en el comportamiento locomotor y la regulación descendente de la vía mTOR en el músculo esquelético.”

“The resistive work of the ventilation induces a decrease in locomotor behavior and down-regulation of the mTOR pathway in skeletal muscle.”

Ramón Pinochet, K, MSc^{1,2}; Máximo Escobar, K, MSc, D²; Franco Díaz, DM^{3,4}; Pablo Cruces, DM^{4,5}.

K: Kinesiólogo; M: Médico; MSc: Magíster; D: Doctor

1. Unidad de Paciente Crítico, Hospital Padre Hurtado, Santiago, Chile

2. Universidad Católica del Maule, Departamento de Kinesiología, Talca, Chile.

3. Facultad de Medicina Clínica Alemana Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile.

4. Unidad de Paciente Crítico Pediátrico, Hospital El Carmen, Maipú, Chile.

5. Facultad de Ciencias de la Vida, Universidad Andres Bello, Centro de Investigación de Medicina Veterinaria, Santiago, Chile.

Título Abreviado: Trabajo resistivo de la ventilación: efectos en comportamiento locomotor y regulación mTOR

Información del Artículo

Recepción: 5 de Abril de 2021

Aceptación: 28 de Mayo de 2021

RESUMEN

Introducción. El músculo diafragma se ve afectado debido a la sobrecarga ventilatoria, sin embargo, el impacto de la inactividad física en las vías de señalización del músculo esquelético asociadas a la síntesis de proteínas, en particular de mammalian target of rapamycin (mTOR) es menos conocida. **Objetivo.** Se busca evaluar el efecto de la sobrecarga resistiva en el comportamiento de la locomoción y la activación de la vía mTOR en los músculos diafragma y sóleo, en un modelo murino. **Métodos.** 22 ratas Sprague-Dawley fueron aleatorizadas a banding traqueal (BT) o Sham (SH) y estudiadas durante 7 días. En los días 1 y 6 se evaluó la conducta de las ratas a través de una prueba de campo abierto (PCA) en 6 minutos. Después de la eutanasia, se cultivó el músculo diafragma y sóleo para medir la expresión (mTOR/proteína total) y la actividad (p-mTORser2448/mTOR) de mTOR. Los valores se expresaron como media y error estándar (EE). La prueba de suma de rangos de Wilcoxon y la prueba U de Mann-Whitney se usaron para evaluar las diferencias dentro y entre los grupos, respectivamente. El nivel de significancia se estableció con un $p < 0,05$. **Resultados.** Todos los sujetos sobrevivieron a la cirugía inicial. No hubo diferencias en la actividad locomotora en el día 1 sin embargo en el día 6 fue significativamente menor en la PCA. La actividad de mTOR en el diafragma fue mayor en BT en comparación con SH. En el músculo sóleo la actividad de mTOR fue menor en el grupo BT en comparación con SH. **Conclusiones.** El aumento del trabajo ventilatorio resistivo se asoció a diferentes efectos sobre la actividad mTOR en diafragma y sóleo. La inhibición de una vía dependiente de kinasa, que induce crecimiento por carga mecánica en el músculo esquelético, se asoció a una disminución de la conducta motora. El papel de esta vía molecular puede ayudar a identificar intervenciones para atenuar la atrofia muscular inducida por el desuso.

Palabras clave: trabajo ventilatorio resistivo; inactividad física; músculo esquelético; mTOR.

ABSTRACT

Introduction. Diaphragm muscle is affected due to respiratory overload, but the impact of physical inactivity on skeletal muscle signaling pathways, associated with protein synthesis, such as mTOR, are less known. **Objective.** We sought to evaluate the effect of resistive overload on locomotion behavior and the activation of the mTOR pathway in the diaphragm and soleus muscle. **Methods.** Twenty-two Sprague-Dawley rats were randomized to Tracheal Banding (TB) or Sham (SH), and they were observed for 7 days. Motor activity was assessed on days 1 and 6 with 6 min-Open-field-test (OFT). After euthanasia, diaphragm and soleus muscle were harvested and mTOR expression (mTOR/total protein) and activity (p-mTORser2448/mTOR) were measured. Variables are expressed as mean and SEM. Wilcoxon signed-rank test and Mann-Whitney U test were used. Significance was set at $P < 0.05$. **Results.** All subjects survived initial surgery. There were no differences in locomotor activity on day 1. At day 6 TB had significant lower locomotor activity in OFT. Activity of mTOR in diaphragm was higher in TB compared to SH. Soleus muscle activity of mTOR was lower in TB group compared to SH. **Conclusions.** Increased resistive ventilatory work was associated to different effects on mTOR activity in diaphragm and soleus muscle. The suppression of the mechanical load-induced growth via kinase-dependent pathway in skeletal muscle was associated to decreased locomotion. The role of this molecular pathway may help to identify interventions to reduce disuse-induced muscle wasting.

Keywords: resistive respiratory work; physical inactivity; skeletal muscle; mTOR.

Abreviaturas

mTOR	mammalian target of rapamycin
SH	sham
BT	banding traqueal
PCA	prueba de campo abierto
TBST	tris-buffered saline with 0.05% Tween 20
EE	error estándar
WV	trabajo ventilatorio
UCI	unidad de cuidados intensivos

Introducción

La masa muscular tiene una dinámica caracterizada por el equilibrio entre la síntesis y la degradación de proteínas. El estrés mecánico es fundamental para el desarrollo y mantenimiento de la función muscular esquelética, fenómeno conocido como mecanotransducción¹⁻³. Por ejemplo, contracciones repetidas de alta intensidad generan sobrecarga mecánica, tensión y estiramiento que activan vías de señalización intracelular que convergen para inducir adaptaciones celulares y moleculares a nivel muscular. Estos cambios que se expresan como hipertrofia y conversión de fibras, resultan en una mejoría del rendimiento y masa muscular⁴⁻⁶. Por otro lado, la descarga mecánica crónica resulta en una disminución en la capacidad de generar resistencia a la tensión y la fatiga debido a la pérdida de masa muscular y otras alteraciones funcionales⁷⁻⁹. Finalmente, las adaptaciones debidas a la carga mecánica en la masa muscular son impulsadas por el equilibrio existente entre la tasa de síntesis y degradación de proteínas^{10,11}.

La inactividad física es una causa frecuente de pérdida de la masa muscular esquelética y esto puede ser más pronunciado en la enfermedad, generando reposo en cama prolongado, movilidad restringida, desnutrición, entre otros factores¹²⁻¹⁴. La debilidad muscular respiratoria y esquelética se ha documentado en pacientes críticos sometidos a ventilación mecánica. Estas observaciones son significativas desde el punto de vista clínico, porque están asociadas con resultados desfavorables que incluyen un aumento en la duración de la ventilación mecánica, el tiempo de hospitalización, la morbilidad y la mortalidad¹⁵⁻¹⁶. No se ha estudiado en profundidad el efecto de la inactividad física sobre el músculo esquelético durante las enfermedades agudas y subagudas en otros entornos que están fuera de la UCI. Por ejemplo, la mayoría de los estudios

experimentales se caracterizan por una intervención específica de la extremidad (modelo de suspensión y transección del tendón) para causar atrofia debido a una inmovilidad forzada, sin estudiar las repercusiones funcionales del trabajo muscular en esos ambientes. Los modelos animales han mostrado una estrecha relación entre los cambios de la vía mammalian target of rapamycin (mTOR) y la hipertrofia/atrofia muscular debido a las modificaciones de la carga mecánica¹⁷⁻²². Por lo tanto, se ha aceptado ampliamente que la vía de señalización mTOR sensible a rapamicina juega un papel central en la regulación de la síntesis de proteínas y la masa muscular durante períodos de aumentos en la carga mecánica^{19, 23, 24}. Sin embargo, el papel de la vía mTOR durante la descarga mecánica es menos conocido^{18,21,25,26} (Figura 1).

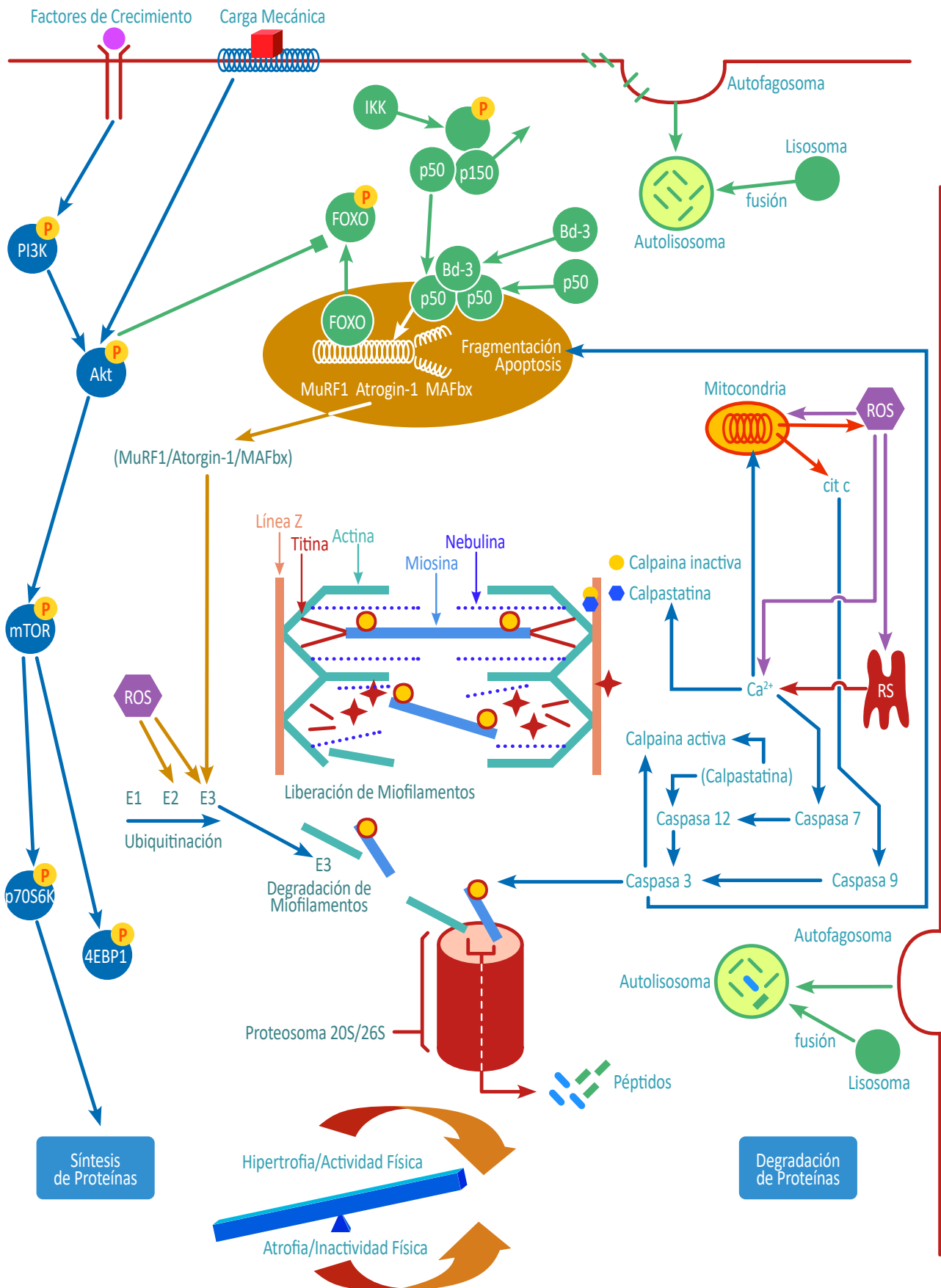
Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la sobrecarga resistiva ventilatoria en el comportamiento locomotor, expresión y activación de la vía de señalización mediada por mTOR en los músculos diafragma y sóleo de rata. Se hipotetiza que una disminución del comportamiento locomotor debido a una sobrecarga resistiva respiratoria induce una regulación descendente de la vía mTOR en el músculo esquelético.

Métodos

- Anestesia animal.

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad Católica del Maule. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a la Guía para el Cuidado y uso de Animales de Laboratorio, 8ª Edición, de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América. El estudio se llevó a cabo de acuerdo con las directrices de ARRIVE guidelines. Este estudio fue un ensayo aleatorio y controlado en ratas. Veintidós ratas macho adultas Sprague-Dawley de 350 gr (55-70 días de edad) del bioterio de nuestra institución, fueron alojadas en jaulas individuales, provistas de agua y alimento ad libitum en una condición controlada de humedad, luz y temperatura en las instalaciones para investigación animal. Los sujetos recibieron anestesia general con una mezcla de gas y aire del 2% de Sevoflurano (Aesica Queenborough Ltd., Reino Unido). Los animales fueron colocados en posición supina para realizar una intubación oro-traqueal con una cánula de 1,8 mm de diámetro externo (Angiocath, Becton Dickinson, NJ, EE.UU.).

Figura 1. Resumen de las vías de señalización molecular de atrofia e hipertrofia muscular, vinculadas al nivel de actividad física y la integración de mTOR como punto clave en esta investigación. En el músculo esquelético existen señales que generan un balance entre la síntesis y degradación de proteínas induciendo atrofia o hipertrofia. ROS, del inglés reactive oxygen species; cit c, citocromo c; RS, retículo sarcoplásmico.



- Grupos experimentales.

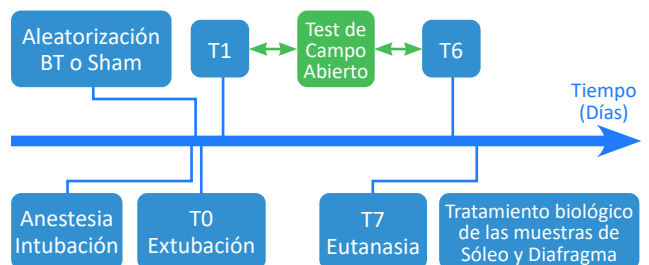
Los animales fueron distribuidos con una secuencia de aleatorización de equilibrio simple en dos grupos: 1) cirugía falsa o sham (SH, n=10) y 2) obstrucción de la vía aérea central o banding traqueal (BT, n=12).

Antes de la intervención quirúrgica en ambos grupos se realizaron técnicas de asepsia para el campo quirúrgico, se administraron analgesia con lidocaína subcutánea local de 1,5 mg/kg (Abbott Labs, N. Chicago, IL, EE.UU.) y ketoprofeno 6 mg/kg im (Merial Canada Inc., Burlington, ON, Canadá), así como profilaxis antibiótica con ampicilina 10 mg/kg im (Sigma -Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.). Después de la desinfección del sitio quirúrgico, la tráquea extratorácica fue expuesta quirúrgicamente en todos los sujetos identificando el 5° anillo traqueal. En todos los animales, una sutura de seda 3.0 estaba atada alrededor de la tráquea. En el grupo de BT el objetivo fue alcanzar una reducción del 60% del diámetro interno de la tráquea utilizando el método descrito por Reid *et al.*^{6,26}. El grupo SH en tanto, fue intervenido de la misma manera a excepción de la ligadura que obstruía la vía aérea. Los animales fueron recuperados brevemente (15 min) y asistidos con ventilación mecánica que entregaba un volumen corriente de 6 ml-1 kg⁻¹, presión espiratoria final positiva de 5 cmH₂O, relación I:E de 1:2, frecuencia respiratoria de 90 respiraciones por minuto y una fracción inspiratoria de oxígeno (FIO₂) del 100% a través de un respirador VentElite para animales pequeños (Aparato de Harvard, Holliston, MA, EE.UU.) en modo volumen control. La temperatura rectal, el electrocardiograma, la frecuencia respiratoria y la saturación de oxígeno fueron controlados usando el Sistema de Monitoreo Fisiológico de Animales Pequeños (Dispositivo de Harvard, Holliston, MA, EE.UU.). En ambos grupos la temperatura corporal se mantuvo usando un calentador externo. La temperatura ambiente se mantuvo a 25°C. También se hizo afrontamiento de la piel con 5 puntos dobles de sutura reabsorbibles. Posteriormente, los animales fueron colocados en posición prona, extubados y apoyados con 100% FIO₂. El destete de la ventilación mecánica se realizó a través de una reducción gradual de la frecuencia respiratoria hasta que se observó una ventilación espontánea completa. Una vez recuperada su vigilia y movilidad los animales fueron colocados en sus respectivas jaulas.

- Mediciones del estudio

Los animales se evaluaron en la noche, durante los siete días consecutivos después del procedimiento quirúrgico, mientras tenían actividad máxima, para registrar vitalidad, movimiento espontáneo, estridor y dificultad respiratoria. Los animales se sometieron a eutanasia el día 7 del estudio, usando 5% Sevoflurano por vía imhalatoria y posteriormente una dosis letal de tiopental (50 mg-1kg⁻¹, Richmond Laboratories, Buenos Aires, Argentina) por administración intraperitoneal. Después de la confirmación de la muerte, los roedores fueron debidamente embolsados y tomados para su cremación de acuerdo con la política institucional. El diagrama experimental se muestra en la Figura 2.

Figura 2. Diagrama experimental. BT, grupo de banding traqueal; SH, grupo Sham; T, punto de tiempo (día).



- Extracción de los tejidos

Después de la eutanasia, las tráqueas de los sujetos fueron extraídas quirúrgicamente. Se realizó una sección transversal a dos anillos traqueales por sobre y bajo la zona de estenosis. El software ImageJ 1.42[®] (Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos, Bethesda, Maryland, EE.UU., <http://rsb.info.nih.gov/ij>) se utilizó para medir el área de diámetro interno de la tráquea.

El músculo diafragma y sóleo fueron extraídos y sumergidos en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C. El sóleo es el músculo esquelético más estudiado en modelos de desuso múrido, porque muestra signos de atrofia antes que cualquier otro^{17,27}.

- Comportamiento locomotor

La expresión espontánea del comportamiento locomotor de los animales fue evaluada en los días 1 y 6 con una prueba de campo abierto (PCA) en seis minutos²⁸. Los animales fueron colocados en una plataforma rectangular (140 x 90 cm) dividida en cuadrados de 10 cm² y grabados en video durante 6 minutos por orden

aleatorio. Las películas fueron analizadas por un investigador ciego a través del software powerdirector® (CyberLink Corp, Taipei, Taiwán). Se evaluó la proporción de tiempo de locomoción y la distancia recorrida por cada animal durante la PCA y los cuadrados de la plataforma que fueron tocados por sus patas delanteras se utilizaron como referencias.

•Medición de la expresión y actividad mTOR

Los músculos congelados fueron homogeneizados en tampón de lisis (Tris 100 mM pH 7.5, EDTA 10 mM, pirofosfato sódico 10 mM, fluoruro sódico 100 mM, ortovanadato de sodio 10 mM, flúor fenilmetilsulfonil 2 mM y aprotinina 0,01 mg/ml). Triton X-100 se añadió a los homogeneizados a una concentración final del 1%, incubado a 4 °C durante 30 min, centrifugado a 13.000 RCF durante 20 minutos a 4 °C y luego el sobrenadante se usó para determinar la concentración total de proteínas según el procedimiento descrito por Bradford y análisis mediante la técnica de Western blot. Para cada muestra, se solubilizaron 70 µg de proteína total en el tampón de la muestra Laemmli (fosfato sódico 10 mM pH 7.0, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5%, SDS al 2%, azul bromofenol al 0.002%), calentado a 95 °C durante 5 minutos, separado por gel de nativante de poliacrilamida con dodecyl sulfato de sodio (SDS-PAGE) y electrotransferido a una membrana de proteínas de Polivinilidenofluoruro (PVDF) (0,45 µm, Pierce Chemical, Rockford, EE.UU.) utilizando el sistema Mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA, EE.UU.). La membrana fue saturada con solución bloqueadora de Tris-buffered saline al 0.05% Tween 20 (TBST) contenida en leche descremada al 5%, en la noche a 4°C. Al día siguiente, la membrana se lavó tres veces por 5 minutos con tampón TBST y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente utilizando anticuerpos primarios policlonales de conejo en TBST con leche descremada al 5%. Los siguientes anticuerpos fueron usados en una dilución 1:1000: anti-mTOR total (#2972, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE.UU.) y anti-mTOR fosforilado en Ser2448 (#2971, Cell Signaling Technology, EE.UU.). Posteriormente la membrana se lavó con TBST durante 5 minutos por tres veces y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario polyclonal anti-IgG (anti-conejo) acoplado a peroxidasa de rábano (Cell Signaling Technology Inc., EE.UU.), en dilución 1:4000 en leche descremada al 5% en TBST. Luego se efectuaron varios lavados para remover el anticuerpo no fijado. Para la

visualización de las bandas se utilizó el reactivo quimioluminiscente West Pico Light Chemiluminescent Subtract (Pierce Chemical, Rockford, EE.UU.). Para tal efecto, la membrana de PVDF fue lavada con TBST, montada en un sistema Hypercassette™ (Amersham Biosciences, Suecia) y se adicionó 1ml de sustrato quimioluminiscente. A continuación, se expuso durante 10 minutos a una película Kodak BioMax XAR Film (Sigma-Aldrich®, EE.UU.). El revelado se efectuó en cuarto oscuro utilizando las soluciones Kodak revelador (D-76) y fijador. Visualizadas las bandas, la película fue escaneada y almacenada para su posterior análisis utilizando el software imageJ 1.42® (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EE.UU., <http://rsb.info.nih.gov/ij>). La tinción de la membrana con Ponceau S se utilizó para asegurar la eficacia de la transferencia de proteínas.

Los niveles de expresión de mTOR se midieron en los músculos diafragma y sóleo. La actividad de mTOR se determinó a través de la proporción de fosfo-mTOR (Ser²⁴⁴⁸) y mTOR total encontrada en ambos músculos.

•Análisis estadístico

El resultado principal del estudio fue la activación de la vía mTOR en los músculos esqueléticos y diafragma. El tamaño de la muestra se calculó para identificar una diferencia del 30% en la activación de la vía muscular mTOR entre grupos experimentales, asumiendo una desviación estándar del 20%, un error alfa de 0,05 m y una potencia del 80%. Todos los valores se expresaron como media y error estándar. La significación estadística se determinó mediante el uso de la prueba de suma de rangos de Wilcoxon para las diferencias dentro de los grupos y la prueba U de Mann-Whitney para las diferencias entre grupos. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el software GraphPad Prism 5.0® (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Se consideró un nivel de significancia un $p < 0.05$.

Resultados

El peso medio del grupo SH fue de $344,5 \pm 22$ gr y para el grupo BT fue de $347,5 \pm 14,4$ gr ($p = 0,2$). Todos los animales sobrevivieron a la cirugía inicial. En el postoperatorio, los animales asignados al grupo BT tuvieron estridor y polipnea, a diferencia del grupo SH que no tuvieron signos de dificultad respiratoria. En el seguimiento clínico, el grupo de BT tuvo una mortali-

dad del 41,7%, y el grupo SH tuvo un 0% ($p < 0,01$) (Figura 3). La pérdida de peso en el séptimo día se observó en ambos grupos y fue más pronunciada en los animales de BT en comparación con el grupo SH ($70,8 \pm 17,2$ frente a $43,3 \pm 27,3$ g, $p = 0,007$). Los sujetos del grupo BT tuvieron estridor, taquipnea y mayor trabajo ventilatorio (WV) en el seguimiento clínico desde el día 1 hasta el 6, mientras que el grupo SH no tuvo ningún problema respiratorio.

El examen *post mortem* reveló que el área interna de la tráquea era de $2,1 \pm 0,2$ mm² en el grupo BT y $3,2 \pm 0,1$ mm² en el grupo SH ($p < 0,01$) (Figura 4).

Figura 3. Gráfico de supervivencia de los sujetos durante el experimento. BT, banding traqueal.

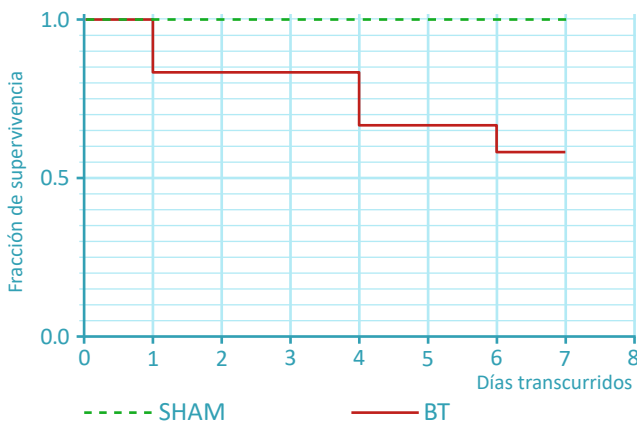
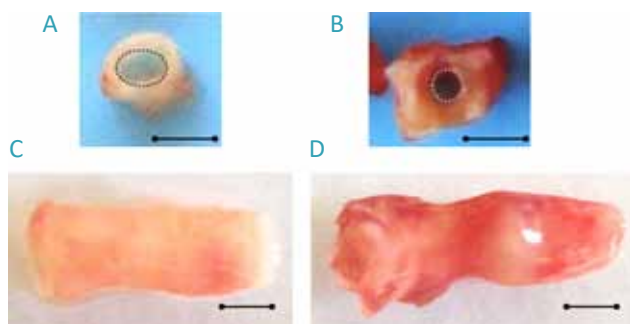


Figura 4. Representación gráfica de la cirugía para reducir el diámetro interno de la tráquea.

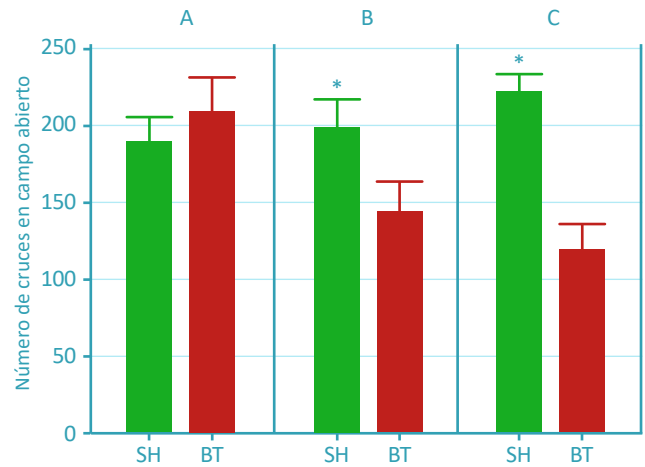


• Comportamiento locomotor

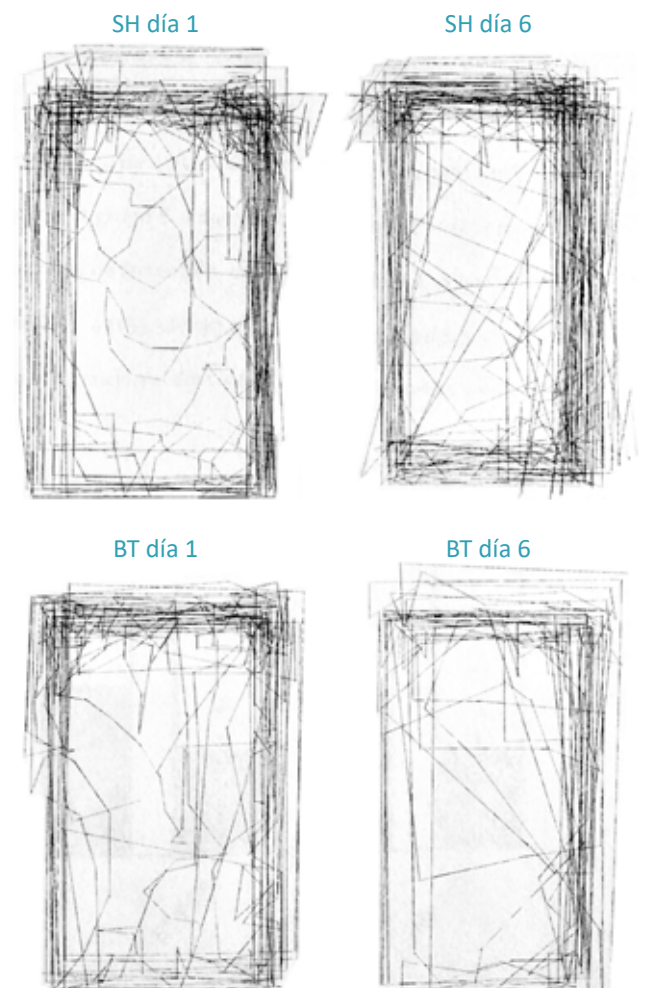
La actividad de locomoción espontánea en la PCA del día 1 en el grupo BT fue de $31,0 \pm 5,4\%$ y $52,0 \pm 5,7\%$ ($p = 0,011$) en el grupo SH; y en el día 6 los resultados fueron $31,0 \pm 4,4$ para BT y $49,0 \pm 5,3\%$ para SH ($p = 0,004$). La distancia recorrida en la PCA en el sexto día fue significativamente menor en el

grupo BT en comparación con el grupo SH (Figura 5). La Figura 6, muestra un mapa representativo de la distancia recorrida para un sujeto SH y un sujeto BT durante la PCA.

Figura 5. Comportamiento locomotor durante la prueba de campo abierto (PCA) en 6 minutos en la línea base (Panel A), día 1 (panel B) y en el día 6 (panel C) en Sham (SH, n= 10) y grupo de banding traqueal (BS, n= 7). (* $p < 0,05$).



Representación de trayectoria entre SH y BT. Comparación del recorrido entre el día 1 y el día 6.



- Mediciones de la vía mTOR

La expresión de mTOR en el músculo diafragma fue mayor en los animales BT en comparación a los animales SH (0.071 ± 0.015 y 0.034 ± 0.005 , $p=0.02$). La actividad de mTOR en el músculo del diafragma fue mayor en los animales BT en comparación a los animales SH (Figura 7). La expresión de mTOR en el músculo sóleo fue menor en los animales BT en comparación con los animales SH ($0,3 \pm 0,1$ y $0,8 \pm 0,2$, $p=0,004$). La actividad de mTOR en el músculo soléo fue menor en el grupo BT en comparación con el grupo SH (Figura 8).

Figura 7. Actividad de la kinasa mTOR en el músculo del diafragma en sham (SH) y el grupo de banding traqueal (BT) al final del experimento. (* $p<0.05$).

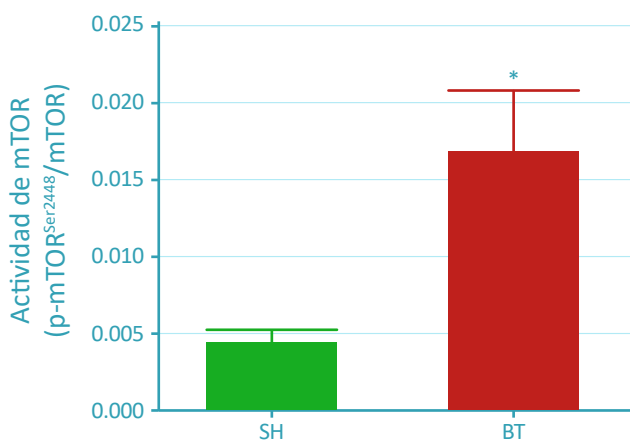
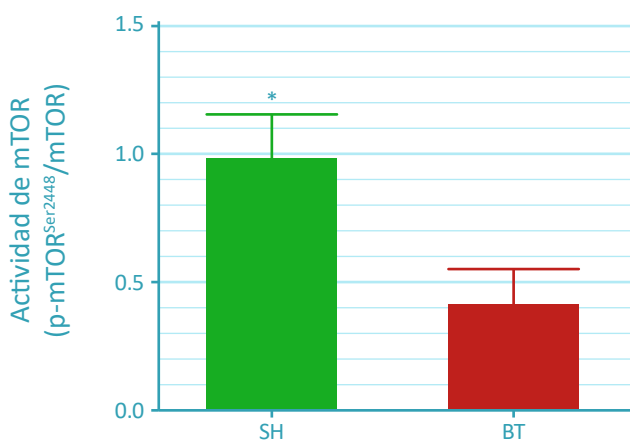


Figura 8. Actividad de la kinasa mTOR en el músculo sóleo en sham (SH) y el grupo de banding traqueal (BT) al final del experimento. (* $p<0.05$)



Discusión

En este modelo murino, estudiamos durante una semana los efectos del aumento subagudo en el trabajo

ventilatorio resistivo, sobre la vía mTOR del músculo diafragma y sóleo. Observamos una reducción en la activación de la vía mTOR del músculo sóleo y una disminución en el comportamiento locomotor de los animales. Por lo tanto, mTOR es una vía relevante en la señalización del músculo esquelético en desuso. Por el contrario, encontramos un aumento en la expresión y activación de mTOR en el músculo diafragma, consistente con la respuesta a sobrecarga mecánica inducida por la estenosis traqueal.

Existe poca información respecto de la sobrecarga del trabajo ventilatorio resistivo como modelo de disfunción. Los sistemas tradicionales de inmovilidad se caracterizan por una intervención directa del sustrato biomecánico que impulsa el movimiento, como en el caso de la suspensión de las patas traseras o la inmovilización de las extremidades²⁹. Así estudiamos un modelo de sobrecarga ventilatoria subaguda sin manipulación directa del músculo esquelético, que resolvía algunas debilidades de los otros modelos. Los mecanismos de la atrofia por desuso se explican en última instancia por descenso en la proporción entre la síntesis y la degradación de proteínas. Estudios experimentales han encontrado que la alteración del equilibrio proteico neto puede ocurrir debido a la disminución de la síntesis de proteínas, aumento de la degradación o una combinación de ambos³⁰. Aunque al parecer en humanos, la reducción en la tasa de síntesis de proteínas es el principal mecanismo que explica la pérdida de masa muscular secundaria al desuso^{31,32}. Creemos que la estenosis traqueal es un modelo adecuado para experimentar la atrofia muscular esquelética por desuso relacionada con la insuficiencia respiratoria aguda, que posteriormente se podría utilizar para estudiar nuevas intervenciones y tecnologías orientadas en atenuar la debilidad adquirida en la UCI y facilitar la recuperación funcional de estas personas. Esto es aún más relevante, dado que mTOR a nivel traduccional sería una ruta de señalización importante en la atrofia por desuso en humanos. Indicando que la ruta mTOR es una de las vías centrales que conducen al aumento de la masa muscular en modelos de alta carga mecánica en el músculo esquelético¹⁷⁻²⁰. Por otro lado, el papel de mTOR como vía de señalización durante la descarga mecánica es menos conocida^{18,21,25}. Nuestros hallazgos muestran que la disminución del comportamiento locomotor en sujetos con BT resultó en la inhibición de la vía mTOR del músculo sóleo. La identificación de mTOR en este entorno sugiere que podría ser un objetivo potencial para las terapias orientadas a prevenir la atrofia por desuso.

El modelo banding traqueal se ha utilizado para investigar las repercusiones de la sobrecarga ventilatoria resistiva en el músculo diafragma^{26,33,34}. Alcanzamos un aumento de la resistencia de las vías respiratorias secundaria a la reducción de los lúmenes traqueales internos que fue similar a los informes anteriores del modelo³⁵. En esta línea, se sabe que esta carga mecánica induce injuria diafragmática, caracterizada por alteración de la estructura del complejo miofibrilar y aumento de la masa diafragmática^{36,37} con diferentes efectos funcionales sobre la fuerza y resistencia a la fatiga^{38,39}. Aunque el papel central de mTOR está en la regulación de la síntesis de proteínas musculares, estudios de esta vía en el músculo diafragmático son limitados⁴⁰. Nuestros nuevos hallazgos sobre la expresión y activación de mTOR en el diafragma debido al aumento de la carga mecánica ayudan a entender la respuesta que subyace a los cambios morfométricos o funcionales observados en estudios anteriores^{36,37}.

Este estudio también tiene limitaciones. En primer lugar, el BT es un modelo de sobrecarga ventilatoria subaguda grave con alta mortalidad; por lo tanto, estos resultados no pueden extrapolarse a condiciones menos graves^{34,35,39}. En segundo lugar, la pérdida de peso observada en los sujetos podría modificar muchas vías moleculares implicadas en el crecimiento y homeostasis del músculo esquelético³⁴. Existen diversas razones que explicarían esta pérdida de peso, como la respuesta a la lesión quirúrgica, la dificultad para deglutir alimentos, la disfunción ventilatoria y el aumento del gasto energético, entre otras. La resistencia anabólica ha sido descrita como una de las causas de la pérdida de masa muscular durante la inactividad. La disminución de la respuesta a un estímulo anabólico como nutrientes, específicamente aminoácidos, disminuye la síntesis de proteínas inducida por la activación de la vía mTOR⁴¹⁻⁴³. No medimos los biomarcadores nutricionales específicos. En tercer lugar, no se tomaron gases arteriales para evaluar la gravedad de la función de intercambio del sistema ventilatorio. La hipoxemia y la hipercapnia pueden tener papeles importantes en muchas respuestas sistémicas, pero estas variables no estaban en los objetivos del estudio, evitando procedimientos dolorosos e innecesarios para los animales⁴⁴⁻⁴⁸. En cuarto lugar, nuestro objetivo fue describir el comportamiento funcional de los animales en este modelo, por lo que no podíamos comparar las variaciones de las vías moleculares y las medidas habituales de trofismo muscular, reportados previamente.

Conclusiones

La sobrecarga mecánica ventilatoria resistiva indujo una mayor expresión y actividad de mTOR en el músculo diafragma asociado con el aumento del trabajo ventilatorio. Además, nosotros observamos una disminución en el comportamiento locomotor en ausencia de una intervención directa del músculo esquelético, que se asoció con una disminución en la actividad de mTOR en el músculo sóleo.

Estos hallazgos son particularmente contingentes y ayudan a entender los mecanismos íntimos que subyacen en la insuficiencia respiratoria crónica/subaguda, como los efectos opuestos en diferentes grupos musculares dependiendo de la intensidad/tipo del estímulo mecánico (aumento de la carga resistiva/reducción de la conducta locomotora) y proporcionan una visión significativa del rol de la vía mTOR en la plasticidad del músculo esquelético, adaptado a condiciones que permiten extrapolar una consideración relevante para la disfunción y el déficit de movimiento, constructos de los cuales depende la calidad de vida y que hoy día son elementos incidentes en el pronóstico de muchos enfermos subsidiarios de soporte vital a causa de la pandemia.

Declaraciones

Aprobación ética y consentimiento para participar: El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad Católica del Maule, Talca, Chile - Registro intramuros 2010.
Consentimiento para la publicación: No aplicable.

Intereses en competencia

Los autores declaran que no hay conflicto de intereses con respecto a la publicación de este artículo.

Las contribuciones de los autores

RP, ME y PC participaron en la concepción y el diseño del estudio; RP y ME fueron los principales investigadores; RP y ME fueron responsables de experimentos bioquímicos; RP, ME, FD y PC fueron responsables de la recopilación de datos; RP, FD y PC fueron responsables de la validación de datos; RP, ME, FD y PC participaron en el análisis de datos; FD llevó a cabo el análisis

estadístico. Todos los autores participaron en la interpretación, escritura y revisión de datos del manuscrito y aprobaron su versión final.

Reconocimientos

Agradecemos a los Drs. Alejandro Pacheco Valles y José Luis Márquez Andrade, por su ayuda con la biología molecular y la técnica de Western blot y al Dr. Renato Tadeu Nachba por sus inestimables ideas sobre la identificación de la actividad de las vías estudiadas. También nos gustaría mostrar nuestro agradecimiento al Dr. Raúl Escobar Henríquez por su asistencia en el diseño del estudio. Y finalmente a todos los que nos acercaron al estudio experimental, basándonos en el concepto que articula la Kinesiología con la genómica.

Referencias

- Kirby TJ (2019). Mechanosensitive pathways controlling translation regulatory processes in skeletal muscle and implications for adaptation. *J Appl Physiol.*; 127: 608-618.
- Dupont-Versteegden EE, McCarthy JJ (2019). Translational control of muscle mass. *J Appl Physiol.*; 127: 579-580.
- Burkholder TJ (2007). Mechanotransduction in skeletal muscle. *Front Biosci.*;12:174-91.
- Cassano M, Quattrocelli M, Crippa S, Perini I, Ronzoni F, Sampaolesi M. (2009) Cellular mechanisms and local progenitor activation to regulate skeletal muscle mass. *J Muscle Res Cell Motil.*;30(7-8):243-53.
- Goldberg AL, Etlinger JD, Goldspink DF, Jablecki C. (1975) Mechanism of work-induced hypertrophy of skeletal muscle. *Med Sci Sports.* 7(3):185-98.
- Baar K, Esser K.(1999) Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. *Am J Physiol.* 276(1 Pt 1):C120-7.
- Brooks NE, Myburgh KH (2014). Skeletal muscle wasting with disuse atrophy is multi-dimensional: the response and interaction of myonuclei, satellite cells and signaling pathways. *Front Physiol.*; 5: 99.
- Gao Y, Arfat Y, Wang H, Goswami N (2018). Muscle atrophy induced by mechanical unloading: Mechanisms and potential countermeasures. *Front Physiol.* 9:235.
- Adams GR, Caiozzo VJ, Baldwin KM. (2003) Skeletal muscle unweighting: spaceflight and ground-based models. *J Appl Physiol.* 95(6): 2185-2201.
- Goodman CA, Mayhew DL, Hornberger TA (2011). Recent progress toward understanding the molecular mechanisms that regulate skeletal muscle mass. *Cellular signalling.*; 23(12): 1896-1906.
- Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. (2013.) Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS Journal.* 280: 4294-4314.
- MacIntyre NR (2006). Muscle dysfunction associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Care.* 51(8):840-7.
- Vogiatzis I, Zakyntinos G, Andrianopoulos V (2012). Mechanisms of physical activity limitation in chronic lung diseases. *Pulm Med.* 2012:634761.
- Rantanen T, Harris T, Leveille SG, et al. (2000) Muscle strength and body mass index as long-term predictors of mortality in initially healthy men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 55(3):M168-73.
- Piva S, Fagoni N, Latronico N (2019). Intensive care unit-acquired weakness: unanswered questions and targets for future research. *F1000Res.* ;8. pii: F1000 Faculty Rev-508.
- Johnson RW, Ng KWP, Dietz AR, et al. (2018). Muscle atrophy in mechanically-ventilated critically ill children. *PLoS One.*;13(12):e0207720.
- Bodine SC, StittTN, Gonzalez M, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol.* 2001;3(11):1014-9.
- Reynolds TH, Bodine SC, Lawrence JC. (2002) Control of Ser2448 phosphorylation in the mammalian target of rapamycin by insulin and skeletal muscle load. *J Biol Chem.* 277(20):17657-62.
- Kubica N, Bolster DR, Farrell PA, Kimball SR, Jefferson LS. (2005) Resistance exercise increases

- muscle protein synthesis and translation of eukaryotic initiation factor 2Bepsilon mRNA in a mammalian target of rapamycin-dependent manner. *J Biol Chem.* 280(9):7570-80.
20. Ogasawara R, Sato K, Matsutani K, Nakazato K, Fujita S. (2014) The order of concurrent endurance and resistance exercise modifies mTOR signaling and protein synthesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 306(10):E1155-62.
21. Dreyer HC, Glynn EL, Lujan HL, Fry CS, DiCarlo SE, Rasmussen BB. (2008) Chronic paraplegia-induced muscle atrophy downregulates the mTOR/S6K1 signaling pathway. *J Appl Physiol.* 104(1):27-33.
22. You JS, Anderson GB, Dooley MS, Hornberger TA. (2015). The role of mTOR signaling in the regulation of protein synthesis and muscle mass during immobilization in mice. *Dis Model Mech.*;8(9):1059-69.
23. McCarthy JJ, Esser KA. (2010). Anabolic and catabolic pathways regulating skeletal muscle mass. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 13(3):230-5.
24. Hornberger TA, Stuppard R, Conley KE, et al. (2004) Mechanical stimuli regulate rapamycin-sensitive signalling by a phosphoinositide 3-kinase-, protein kinase B- and growth factor-independent mechanism. *Biochem J.*;380 (Pt 3):795-804.
25. You JS, Anderson GB, Dooley MS, Hornberger TA. (2015) The role of mTOR signaling in the regulation of protein synthesis and muscle mass during immobilization in mice. *Dis Model Mech.*;8(9):1059-69.
26. Reid WD, Noonan J, Chung F, Tesler-Mabe C. (1992) Ventilatory failure induced by tracheal banding in the hamster. *J Appl Physiol.* 73(4):1671-5.
27. Fitts RH, Trappe SW, Costill DL, et al. (2010) Prolonged space flight-induced alterations in the structure and function of human skeletal muscle fibres. *J Physiol.*;588 (Pt 18):3567-92.
28. Pisula W. (1994). Sequential analysis of rat behavior in the open field. *International Journal of Comparative Psychology* 7:194-201.
29. Hornberger TA, Hunter RB, Kandarian SC, Esser KA. (2001) Regulation of translation factors during hindlimb unloading and denervation of skeletal muscle in rats. *Am J Physiol Cell Physiol.* 281(1):C179-87.
30. Bodine SC. (2013) Disuse-induced muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol*;45(10):2200-8.
31. Rennie MJ, Selby A, Atherton P, et al. (2010). Facts, noise and wishful thinking: muscle protein turnover in aging and human disuse atrophy. *Scand J Med Sci Sports.* 20(1):5-9.
32. Wall BT, van Loon LJ. (2013). Nutritional strategies to attenuate muscle disuse atrophy. *Nutr Rev* 71(4):195-208.
33. Angulo M, Taranto E, Soto JP, et al. (2009) Salbutamol improves diaphragmatic contractility in chronic airway obstruction. *Arch Bronconeumol.* 45(5):230-4.
34. Tarasiuk A, Segev Y. (2007). Chronic upper airway resistive loading induces growth retardation via the GH/IGF-I axis in prepubescent rats. *J Appl Physiol.* 102(3):913-8.
35. Krupnick AS, Zhu J, Nguyen T, et al. (2003) Inspiratory loading does not accelerate dystrophy in mdx mouse diaphragm: implications for regenerative therapy. *J Appl Physiol.* 94(2):411-9.
36. Reid WD, Huang J, Bryson S, Walker DC, Belcastro AN. (1994). Diaphragm injury and myofibrillar structure induced by resistive loading. *J Appl Physiol.* 76(1):176-84.
37. Reid WD, Belcastro AN. (2000) Time course of diaphragm injury and calpain activity during resistive loading. *Am J Respir Crit Care Med.* 162(5):1801-6.
38. Tarasiuk A, Scharf SM, Miller MJ. (1991) Effect of chronic resistive loading on inspiratory muscles in rats. *J Appl Physiol.* 70(1):216-22.
39. Prezant DJ, Aldrich TK, Richner B, et al. (1993) Effects of long-term continuous respiratory resistive loading on rat diaphragm function and structure. *J Appl Physiol.* 74(3):1212-9.
40. Argadine HM, Mantilla CB, Zhan WZ, Sieck GC (2011). Intracellular signaling pathways regulating net protein balance following diaphragm muscle denervation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 300(2):C318-27.

41. Anthony JC, Yoshizawa F, Anthony TG, Vary TC, Jefferson LS, Kimball SR. (2000) Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J Nutr.* 30(10):2413-9.
42. Cuthbertson D, Smith K, Babraj J, et al. (2005) Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle. *FASEB J.*;19(3):422-4.
43. Langen RC, Gosker HR, Remels AH, Schols AM. (2013). Triggers and mechanisms of skeletal muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 45(10):2245-56.
44. Pate KM, Davenport PW. (2013) Tracheal occlusion conditioning causes stress, anxiety and neural state changes in conscious rats. *Exp Physiol.* 98(3):819-29.
45. Okitsu Y, Nehashi S, Iiyori N, Nishino T. (2004). Respiratory and behavioural compensation during chronic severe loading in a hypoxic rat model. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 31(1-2):14-21.
46. Favier FB, Costes F, Defour A, et al. (2010) Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin pathway in skeletal muscle is associated with increased REDD1 expression in response to chronic hypoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 298(6):R1659-66.
47. von Leupoldt A, Dahme B. (2005). Differentiation between the sensory and affective dimension of dyspnea during resistive load breathing in normal subjects. *Chest.* 128 (5):3345-9.
48. Naqvi F, Haider S, Batoool Z, Perveen T, Haleem DJ (2012). Sub-chronic exposure to noise affects locomotor activity and produces anxiogenic and depressive like behavior in rats. *Pharmacol Rep.*;64(1):64-9.

Conflictos de interés

Los Autores declaran no tener conflictos de interés.

Presentación previa

Este resumen fue presentado en el 31° Congreso Anual ESCIM-LIVES, Paris 20-24 October 2018. Tesis para alcanzar el Grado Académico de Magíster en Kinesio-

logía. Departamento de Kinesiología. Universidad Católica del Maule (2015-2019).

Correspondencia

Klgo. Ramón Pinochet, rpinochetu@gmail.com
Sendero el Rayo Poniente 3962, Puente Alto. Chile.
Código Postal 8150000.