

# Valor diagnòstic de les miosines sèriques en les lesions musculars

BALIUS R.<sup>(1)</sup>, ESTRUCH A.<sup>(1) (2)</sup>,  
GUERRERO M.<sup>(2)</sup>, CADEFÀU J.A.<sup>(2)</sup>,  
PARRA J.<sup>(2)</sup>, RODAS G.<sup>(1)</sup>, CUSSÓ R.<sup>(2)</sup>

1. Centre d'Estudis d'Alt Rendiment  
(CEARE, Generalitat de Catalunya).

Barcelona. Espanya.

2. Departament de Ciències  
Fisiològiques I, Facultat de Medicina,  
IDIBAPS. Universitat de Barcelona

CORRESPONDÈNCIA:

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

**RESUM:** El diagnòstic de les lesions musculars que pateixen els esportistes es realitza mitjançant un diagnòstic clínic acompanyat de proves de confirmació per tècniques d'imatge de la lesió (ecografia i/o ressonància magnètica nuclear) i tècniques de laboratori per anàlisi de sang que detecten la presència de marcadors sèrics inespecífics de lesions musculars.

Les proves per imatge han demostrat ser excel·lents per a la detecció i confirmació de les lesions de Grau II i III. Tanmateix, les lesions de Grau I queden, moltes vegades, sense confirmació per aquestes tècniques. Els marcadors sèrics tradicionals es comporten de manera similar, essent tots ells no específics del múscul esquelètic.

La valoració de les miosines ràpida y lenta en sang després de 48 hores de produir-se la lesió ha demostrat ser un bon paràmetre per a la detecció de les lesions tipus I especialment, basant-se en el fet que la miosina ràpida és un marcador exclusiu del múscul esquelètic.

El diagnòstic correcte de les lesions de Grau I pot facilitar la prevenció de la progressió de la lesió en esportistes sotmesos a entrenaments i competicions continuades, poden ajudar al metge esportiu en les seves decisions.

**PALABRAS CLAVE:** Lesió, múscul, diagnòstic, 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.

## INTRODUCCIO

El múscul és sensible als protocols de contracció i treball als que es veu sotmès, donat que la seva estructura està preparada per suportar-los i adaptar-se a noves situacions d'esforç. Tanmateix, la seva integritat es troba afectada en major o menor mesura pel sobreesforç, produint-se trencaments que denominem lesions musculars. Aquestes lesions poden produir, en major o menor grau, incapacitat per continuar l'esforç.

Un exercici extenuant no habitual provoca lesions ocasionals en les estructures del múscul esquelètic.<sup>(8)</sup> Està ben documentat que l'exercici que inclou accions musculars excèntriques provoca canvis directes més severos des d'un punt de vista histopatològic<sup>(1)</sup> i bioquímic<sup>(12,18)</sup> i símptomes indirectes de lesió muscular<sup>(9)</sup> que en el cas d'exercici concèntric.

Exercicis excèntrics de molta força condueixen a lesions musculars amb canvis significatius en l'estructura muscular i en la seva funció. S'indueixen canvis en les membranes de les fibres musculars<sup>(1,14)</sup> i en el citoesquelet caracteritzats per canvis morfològics com el trencament miofibrilar i de la línia Z del sarcòmer a nivell cel·lular<sup>(3,9)</sup> i vacuolització del reticle sarcoplàsmic<sup>(1,10,11)</sup>.

Per poder detectar aquestes lesions s'han dissenyat tecnologies específiques mitjançant mètodes directes i indirectes. Com a mètode directe existeixen les biòpsies musculars que poden aportar informació tant dels components com de l'estructura del múscul (anàlisi metabòlic i histològic). Entre els mètodes indirectes es troben les instruments que permeten valorar les característiques del múscul sense perjudicar-lo, com són la ressonància magnètica nuclear (RM), l'ecografia i la electromiografia. Dintre d'aquest grup es troben també els marcadors sèrics de lesió muscular entre les quals es troben: aspartat aminotransferasa (AST), alanina amino transferasa (ALT), lactat deshidrogenasa (LDH), creatina quinasa (CK), mioglobina (Mb), proteïna de transport d'àcids grassos del cor (H-FABP), anhidrasa carbònica III i les proteïnes contràctils troponines i miosines (MHC)<sup>(18)</sup>.

Soricher i cols.<sup>(18)</sup> van exposar la necessitat de disposar de marcadors sèrics ideals de lesió de fibra muscular esquelètica. Un requeriment és que el marcador sigui absolutament específic de les fibres musculars per permetre un diagnòstic segur de la lesió muscular. Cap dels marcadors analitzats habitualment ho són.

El múscul esquelètic és un teixit amb una heterogeneïtat en el tipus de fibres. Està format per múltiples tipus de fibres<sup>(15)</sup> tot i que es poden agrupar en fibres de tipus I i II (IIa

i IIb), la proporció de les quals varia segons el tipus de múscul i, fins i tot, dintre de les diferents regions del mateix<sup>(13)</sup>. Tot i que la proporció entre ambdós tipus de fibres no és fàcil de modificar, depenent del tipus d'exercici que es realitza, hi ha lleugers canvis entre les de tipus I, fibres aeròbiques i molt resistents a la fatiga i les de tipus II, més anaeròbiques i menys resistents a la fatiga<sup>(6)</sup>. Existeixen diverses formes de caracteritzar el tipus de fibres. Es poden caracteritzar mitjançant tintaments histoquímics (pel seu contingut en molècules o enzims característics dels metabolismes més aeròbics o anaeròbics) o mitjançant el seu contingut proteic. Algunes de les proteïnes contràctils presenten isoformes diferents segons el tipus de fibra. Una d'elles és la miosina que pot presentar cadenes pesades i lleugeres diferents segons el tipus de fibra sigui ràpida o lenta.

La miosina, una de les proteïnes més importants de l'aparell contràctil, existeix en múltiples isoformes, fet que contribueix a la diversitat funcional de les fibres musculars. Les diferències funcionals més importants de les isoformes de la miosina resideixen en una porció de la cadena pesada<sup>(15)</sup>.

Els marcadors emprats habitualment com ara CK, HFABP, Mb, TnI, a més de no ser totalment específics per al múscul esquelètic, assoleixen un valor màxim abans de les 10 hores posteriors a l'origen de la lesió i baixen considerablement abans d'arribar a les 24 hores després de la situació estressant. La majoria de lesions es produeixen dies festius, per tant, és molt fàcil que passin aquestes 10-12 hores crítiques per realitzar l'anàlisi del pacient. Tot sovint, les lesions acabades de produir no van acompanyades de dolor i un dia més tard pot ser suficient per a què els marcadors de baix pes molecular ja s'hagin degradat i no es trobi cap rastre d'ell en el sèrum. Les troponines són proteïnes molt específiques del tipus de fibra, de baix pes molecular, però són susceptibles de ser ràpidament proteolitzades; aquesta pot ser la raó de què presentin una vida mitja molt curta al sang<sup>(8)</sup>.

La miosina presenta un perfil ideal com a paràmetre per estudiar i és assignable directament al grau de lesió, ja que gràcies al seu elevat pes molecular la seva aparició en sang només es pot explicar per una lesió profunda de la fibra. La miosina ràpida és característica únicament del múscul esquelètic ràpid, mentre que la lenta és comú únicament en els músculs esquelètics i cardíac. El valor màxim de la miosina lenta en sang ha estat mesurat per Schiaffino i Reggiani<sup>(16)</sup> i presenta el seu màxim després de 48 i 72 hores de la lesió.

L'objectiu del present treball és valorar les lesions musculars utilitzant com a marcadors les miosines ràpides i lentes

presentes en el sèrum d'esportistes després de 48 hores d'haver patit una lesió. Es compararà l'eficàcia d'aquest marcador amb la detecció de la lesió per ecografia, RM i altres marcadors sèrics tradicionals.

## METODES

**Materials:** Anticossos monoclonals anti-miosina (múscul esquelètic ràpid) clon My-32 (Sigma), anticossos monoclonals anti-miosina (múscul esquelètic lent) clon NOQ7.5.4D (Sigma). Protein A-agarose (Sigma).

**Participants:** 42 atletes joves, d'edats compreses entre 18 i 25 anys, que practiquen atletisme, hoquei, tennis, futbol i pentatló van participar en l'estudi després de patir dolor i/o lesions. Els controls van ser joves sedentaris de la mateixa edat. L'estudi va ser aprovat pel Comitè Ètic de la Universitat de Barcelona i de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona.

Les lesions musculars van ser classificades en tres graus, segons el tipus de trobada clínica. Grau I (cruiximent i allargament muscular, esquinçament muscular mínim). Grau II (trençament fibrilar i esquinçament muscular moderat). Grau III (trençament de fibres i esquinçament muscular evident).

Es va practicar una extracció de 2ml de sang dels individus controls i dels atletes, 48 hores després d'haver patit algun problema muscular.

**Tractament de la mostra:** Els 2 ml de sang es van recollir en un tub Vacutain. La sang va ser centrifugada i el sèrum es va concentrar amb proteïna A-agarosa per immunoprecipitació. La solució va ser barrejada amb PBS, proteïna A-agarosa i anticossos anti-miosina ràpida i lenta. Es va incubar a 37°, es va centrifugar a 5000xg i el precipitat es va resuspendre en el tampó de càrrega de l'electroforesi. La mostra es va col·locar en un gel de poliacrilamida per a la detecció per western blot. Les bandes electroforètiques obtingudes van detectar-se amb Ultra-supersignal i Hyperfilm TM ECL.

La quantificació va fer-se per densitometria 5200C i les dades tractades amb el programa Quantity One 1-D (BioRad) en un Hewlet Packard Scanjet 5200C.

## Valoració d'activitats enzimàtiques

Creatinasa quinasa (CK), lactat deshidrogenasa (LHD), aspartat aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALY) van ser determinades amb l'autonaltzador Technicon

DAX System, Clinical Method, Bayer Publication nº SM4-1140L95 (1995). CK d'acord amb el mètode de Szasz i cols.<sup>(19)</sup>, LHD amb el mètode de Bass i col.<sup>(2)</sup>, ASAT segons el de Bergmeyer i col.<sup>(4)</sup> i ALAT segons el de Wroblewski i col.<sup>(20)</sup>. Mioglobina (Mb) pel mètode RIA automatitzat de Mallinckrod (Diagnostica, Dietzenbach, Alemanya) i les proteïnes pel mètode de Bradford<sup>(5)</sup>.

## Valoració per imatges

Les ecografies van ser realitzades en el CEARE i en el Departament d'ecografies de la Clínica FIATC. Es van utilitzar aparells d'ultrasonografia amb sonda multifreqüència de Toshiba Medical Sistem (Just-Vision en CEARE, Power-Vision en FIATC).

Les Ressonàncies Magnètiques Nuclears (RM) van ser realitzades pel Departament de Ressonància Magnètica de la Clínica Corachán, utilitzant un aparell Siemens Symphony 1.5 TESS.

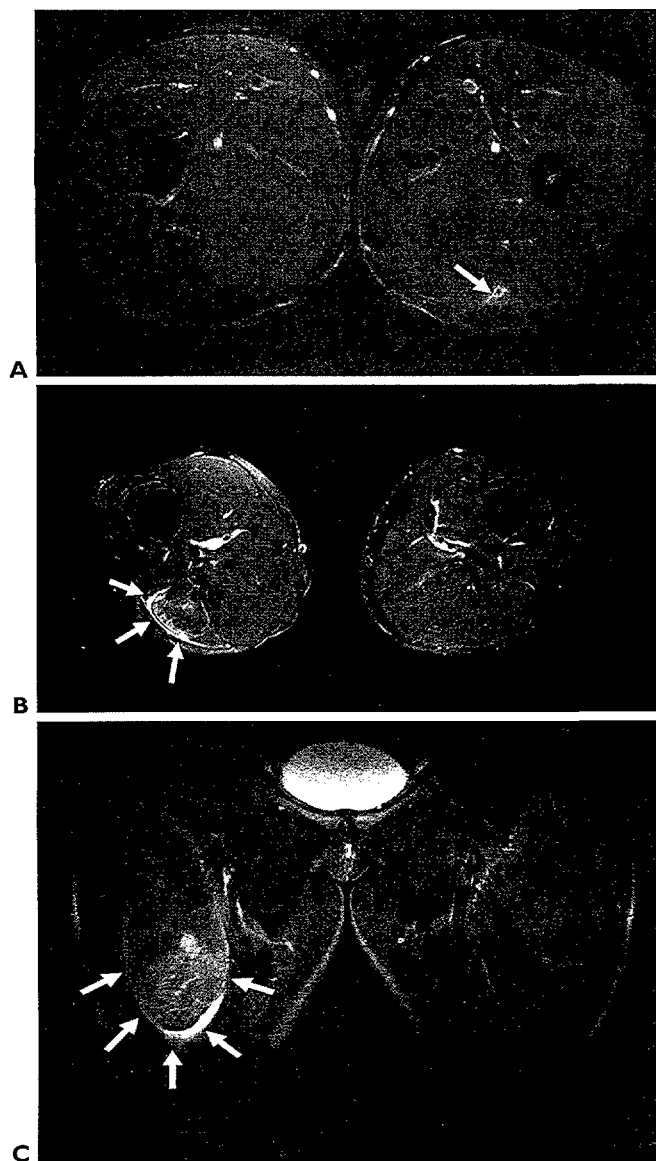
Ambdós tipus de proves obtenen resultats tant més evidents quan major és la lesió. Així, en les lesions de Grau I, l'ecografia acostuma a objectivar lesions (sufusió hemàtica i el defecte d'algunes fibres), passats dos o tres dies de l'accident, mentre que la RM mostra des del primer moment edema muscular. Les lesions de Grau II mostren edema i defecte fibrilar tant per ecografia com per RM i les de Grau III objectiven un defecte major associat a hematoma i edema muscular. Tant l'ecografia com la RM serveixen per a control evolutiu de la lesió, observant com se'n va l'edema i apareix la reparació fibrilar.

## RESULTATS

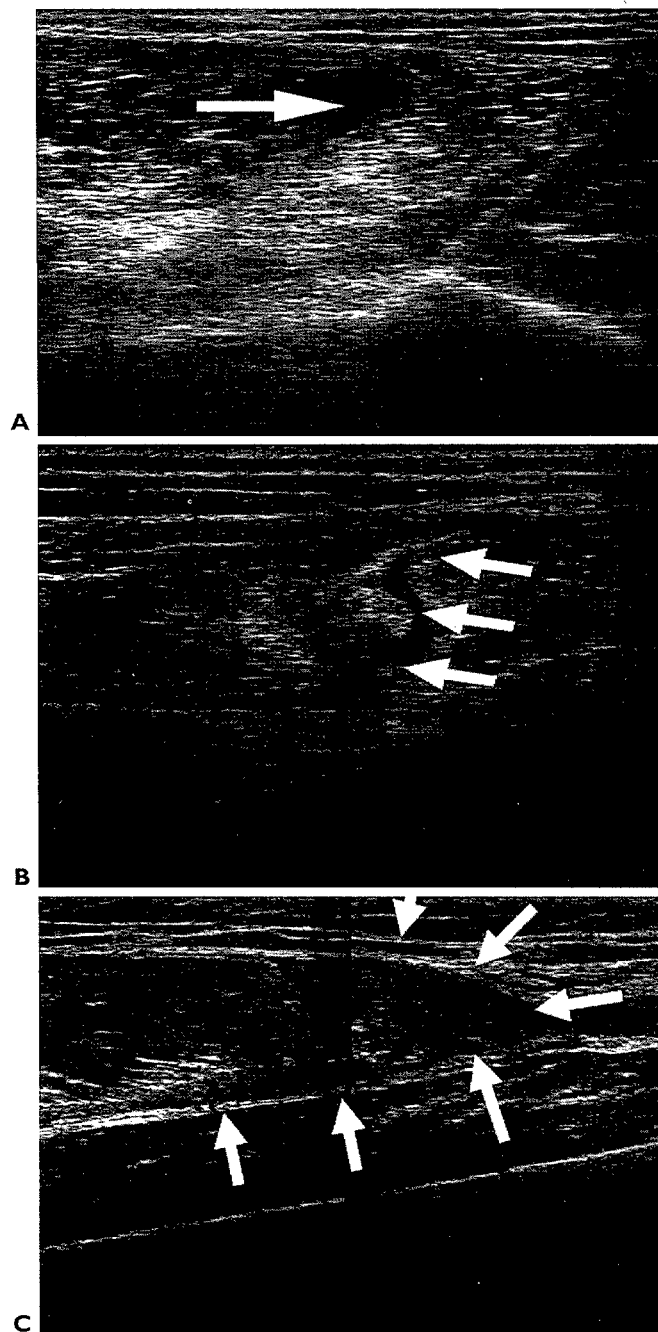
### 1. Imatges per RM

En la figura 1 es mostren tres imatges per ressonància magnètica nuclear de diferents graus de lesió muscular. 1 A): Lesió de Grau I en el terç superior de la cara posterior de cuixa dreta. Observem, en tall axial, zona d'edema muscular (augment de senyal) que tradueix lesió recent en bíceps femoris (fletxes). 1 B): Lesió de Grau II en terç mig-distal de la cara posterior de cuixa esquerra. Observem, en tall axial, zona d'edema (augment de senyal) i defecte fibrilar que tradueix lesió recent en bíceps femoris (cap llarg) (fletxes). A C). Lesió Grau III en terç distal de la cuixa de cara anterior. Observem, en tall coronal, gran zona d'edema (augment de senyal) i defecte fibrilar extens del rectus femoris, en el seu terç distal (fletxes).

**Figura I** Ressonàncies magnètiques nuclears de diferents graus de lesió musculars:  
A) Lesió de Grau I. B) Lesió de Grau II.  
C) Lesió de Grau III.



**Figura II** Ecografies de diferents graus de lesió muscular:  
A) Lesió de Grau I. B) Lesió de Grau II.  
C) Lesió de Grau III.



## 2. Imatges ecogràfiques

En la figura 2 es mostra la correspondència ecogràfica de les lesions mostrades en la Figura 1. 2 A): lesió de Grau I. La ecografia mostra, en tall transversal, zona de defecte fibrilar que es situa entre el bíceps femoris i el semitendíno. 2 B): lesió de Grau II. L'ecografia mostra, en tall transversal, zona més extensa de defecte fibrilar i subfusió hemàtica al cap llarg del bíceps femoris. 2 C). Lesió de Grau III. L'ecografia mostra, en tall longitudinal, defecte muscular complet del rectus femoris (fletxes).

## 3. Diagnòstic clínic, enzims marcadors i nivells de miosines en els músculs normals i lesionats

En la Taula I s'observen els valors normals dels sèrums d'atletes controls i dels atletes amb diversos graus de lesions musculars. S'observa que després de 48 hores de la instauració del problema muscular dels marcadors, LDH, AST, ALT,

**Taula I** Comparació dels resultats obtinguts amb les diferents tècniques

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

CK i Mb no mostren augment en les lesions de Grau I. Només la miosina ràpida resulta un marcador amb valors molt elevats, seguit de la miosina lenta. El resultat de les ecografies i la RM en les lesions de Grau I mostren resultats confosos en alguns casos, donant resultats negatius o positius que no garanteixen el reconeixement total de la lesió. En les lesions de Grau II i Grau III, les tècniques ecogràfiques i de RM són molt eficaces, ja que detecten les lesions via imatge.

En les lesions de Grau II, els marcadors sèrics presenten lleugers augments només en CK, essent els majors increments els de ambdós tipus de miosina, que poden arribar fins a 10 vegades sobre el seu valor normal. Les lesions de Grau III són correctament detectades pels marcadors CK, i per ambdós tipus de miosines.

## DISCUSSIO

Els diferents músculs humans estan formats per una barreja de fibres lentes i ràpides pròxima al 50%, a diferència del que passa en certs animals que posseeixen músculs amb un 90% de fibres ràpides només, i altres amb un 90% de fibres lentes. Concretament, el vastus lateralis de joves atletes entre 15 i 18 anys de raça caucàsica presenten un 36,5 % de fibres de tipus lent i un 63,5 % de fibres de tipus ràpid, i d'elles un 52,3 % són fibres tipus IIa, un 8,1 % tipus IIb i un 3,1 % de tipus IIc<sup>(6)</sup>. L'existència de músculs mixtos en humans farà que les lesions siguin la causa de la sortida de miosines lentes i ràpides a la sang. Tanmateix, degut a què la resistència a les lesions i a la fatiga d'ambdós tipus de fibres no és la mateixa, podran trobar-se en sang MCH lentes o ràpides segons sigui el tipus de fibres lesionades. En general, les fibres ràpides són més fatigables i més sensibles a la lesió. Per això, poden esperar que les fibres ràpides, que es fatiguen amb més facilitat, donin sortida a MCH ràpida abans que les lentes en front d'exercicis menys intensos. Les MCH lentes s'extratranvasaran en condicions més fatigants i probablement la seva detecció a la sang serà l'expressió d'una lesió més important.

Per altra banda, la presència de MCH ràpida en sang és senyal d'afectació única de múscul esquelètic, per això, constitueix un marcador absolutament específic. La presència de MHC lenta podria indicar la presència de lesió muscular en múscul esquelètic o/i en cor. Tanmateix, donat el tipus de pacient que es sotmet al test, si són esportistes als quals es descarta una lesió cardíaca, la seva detecció en sang respondria com un marcador de lesions de fibres lentes, amb les conseqüències que aquesta dada pogués aportar.

Hem desenvolupat un mètode de detecció de miosines en sang basat en el reconeixement específic per anticossos anti-miosina ràpida i lenta. Hem estudiat un grup d'esportistes procedents d'esports diversos que es van presentar a la consulta mèdica per dolors musculars. Se'ls hi va practicar un examen mèdic, una ecografia, una ressonància magnètica i unes anàlisis de sang per valorar la presència de diversos enzims que s'utilitzen com a marcadors muscular, i les miosines lenta i ràpida. També van ser estudiats 9 joves de les mateixes edats que els atletes, però que no practicaven cap esport de forma continuada, només de forma esporàdica i com a diversió i que van ser catalogats com normals.

Els nostres resultats indiquen que en estat normal, la concentració de miosina lenta i ràpida en sang no superava els 300 µg/ml. Els pacients diagnosticats amb lesions Grau 1, que no són visibles per ecografia o/i per RM, presentaven valors elevats d'ambdues miosines tot i que les miosines ràpides eren superiors a les lentes mostrant una relació ràpida / lenta superior a 1. Els altres marcadors enzimàtics no es trobaven modificats comparant amb els controls. En les lesions Grau II i III, que ja estaven diagnosticades per ecografia i RM, es mostrava un increment de les miosines tant ràpides com lentes, tot i que ara les lentes superaven a les ràpides mostrant una relació ràpida / lenta inferior a 1. Com més important era la lesió, més augmentava la concentració de miosines lentes respecte a les ràpides. Les CK també van mostrar un augment en la mateixa direcció que la lesió muscular creixent en el mateix sentit que les miosines lentes, mostrant ser un molt bon marcador per a les lesions tipus III especialment.

S'arriba a la conclusió que el mesurament de miosina ràpida és un marcador molt sensible per a les lesions de grau I, si més no tant com la prova de RM i més que l'ecografia i el diagnòstic clínic. Per altra banda, és un marcador totalment específic del múscul esquelètic, propietat que no comparteix amb cap dels marcadors que actualment s'utilitzen, com CK i mioglobines. També presenta l'avantatge de què és més sensible i més estable en sang, donat que presenta un màxim a les 48 hores de la lesió i perdura durant més temps, fet pel qual és més fàcil utilitzar-lo en diagnòstics que no es realitzen al moment i que poden utilitzar-se, però, com a paràmetre per seguir l'evolució de la lesió muscular. Per això, con-

cloem que la determinació de miosines ràpides i lentes pot ser un bon sistema d'ajut al diagnòstic de les lesions musculars especialment per aquelles que són difícilment detectable per altres procediments.

#### AGRAIMENTS

Els autors agraeixen la participació dels voluntaris i la cooperació de CEARE i d' IDIBAPS de la Facultat de Medicina. L'estudi ha estat finançat principalment per dos ajuts del Consell Català de l'Esport (Generalitat de Catalunya) i una petita col·laboració del Consell Superior d'Esports (MEC).

#### Bibliografia

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, Barbato 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. Lixel 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.