

Análisis estructural y expresión de los factores de necrosis tumoral y crecimiento insulina-*like* en los músculos respiratorios de pacientes con EPOC. ¿Son válidas las muestras obtenidas en el curso de una toracotomía por neoplasia pulmonar localizada?

C. Casadevall^a, C. Coronell^a, J. Minguella^{b,c}, L. Blanco^{a,d}, M. Orozco-Levi^{a,d}, E. Barreiro^a, J. Broquetas^{c,d} y J. Gea^{a,d,e}

^aUnitat de Recerca en Múscul (URM). IMIM-Hospital del Mar. Barcelona.

^bSecció de Cirurgia Toràcica. IMIM-Hospital del Mar. Barcelona.

^cUniversitat Autònoma de Barcelona. Barcelona.

^dServei de Pneumologia. IMIM-Hospital del Mar. Barcelona.

^eUniversitat Pompeu Fabra. Barcelona. España.

OBJETIVO: Los estudios estructurales y de expresión de diversas sustancias en músculos respiratorios de seres humanos se han servido de diversos modelos para la obtención de las muestras. Entre ellos destacan la toma de tejidos en autopsias, la biopsia muscular en el curso de una toracotomía por lesión pulmonar localizada (TLL) y la biopsia ambulatoria en sujetos sin comorbilidad (TA). Los 2 primeros modelos adolecen de las posibles interferencias de factores relacionados, respectivamente, con la muerte o la enfermedad que motiva el acto quirúrgico. La TA, aunque obvia los inconvenientes de los otros 2 modelos, no permite obtener muestras del diafragma, principal músculo respiratorio. El objetivo de este trabajo fue analizar la estructura fibrilar y expresión de la principal citocina inflamatoria –factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)– y del factor de crecimiento muscular insulina-*like* (IGF-1) en el músculo intercostal externo de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, comparando los resultados obtenidos con los modelos de TLL y TA.

MÉTODOS: Se tomaron prospectiva y consecutivamente muestras del músculo intercostal externo (quinto espacio, línea axilar anterior) en 15 pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (66 ± 6 años; volumen espiratorio forzado en el primer segundo del $49 \pm 9\%$ ref., presión arterial de oxígeno de 75 ± 9 mmHg). Las muestras se tomaron mediante TLL (8 pacientes, todos ellos con neoplasia pulmonar pero cuidadosamente seleccionados para descartar efec-

tos sistémicos) o TA (7 pacientes), excluyéndose en el segundo caso la presencia de comorbilidad importante. Las muestras se procesaron para análisis estructural fibrilar (inmuno-histoquímica e histoquímica enzimática) y de expresión génica de TNF- α e IGF-1 (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real).

RESULTADOS: El análisis estructural de las fibras no mostró diferencias entre ambos grupos. Tampoco se observaron diferencias en la expresión de TNF- α o IGF-1.

CONCLUSIONES: Con criterios de selección rigurosos, el modelo de TLL parece adecuado para el estudio de las características estructurales y de expresión de citocinas inflamatorias y factores de crecimiento en el músculo intercostal externo. Puede además inferirse que probablemente la TLL también sea útil para esos objetivos en el caso del diafragma, para el que no existe una técnica alternativa en la actualidad.

Palabras clave: Músculos respiratorios. Fibras. TNF- α . Factor de crecimiento. Toracotomía.

Analysis of Respiratory Muscle Structure and Tumor Necrosis and Insulin-Like Growth Factor Expression in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Are Samples Valid if Obtained During Thoracotomy Performed Because of Localized Pulmonary Neoplasia?

OBJECTIVE: Various methods have been used to obtain samples to study the structure of human respiratory muscles and the expression of diverse substances in them. Samples are most often obtained from autopsies, from muscle biopsies during thoracotomy performed because of a localized pulmonary lesion (TLL), and from ambulatory thoracoscopic biopsy in patients free of comorbidity (AT). The disadvantage of the first 2 of these methods lies in the possibility of interference from factors related to the pa-

El Dr. C. Coronell ha sido financiado por una Beca de Movilización de Investigadores y Profesores Extranjeros del Ministerio de Ciencia y Tecnología (ref. 72129052).

El trabajo ha contado con cofinanciación del V Programa Marco de la Unión Europea (ref. QLRT-2000-00417), del Plan Nacional I + D del Ministerio de Ciencia y Tecnología (ref. SAF 2001-0426) y de la Red RESPIRA (RTIC C03/11, FIS, ISC III), de la SEPAR.

Correspondencia: Dr. J. Gea.
Servei de Pneumologia. IMIM-Hospital del Mar.
Pg. Marítim, 27. 08003 Barcelona. España.
Correo electrónico: jgea@imim.es

Recibido: 3-7-2003; aceptado para su publicación: 26-11-2003.

tient's death in the first case or from the disease that necessitated surgery in the second. Although AT is free from the disadvantages of the other 2 methods, it is impossible to obtain samples of the diaphragm –the principal respiratory muscle– with this procedure. The objective of this study was to analyze the fibrous structure of the external intercostal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease and to quantify the expression of the principal inflammatory cytokine –tumor necrosis factor alpha (TNF- α)– and of insulin-like growth factor (IGF-1) in the same muscle, comparing the results obtained with TLL and AT samples.

METHODS: Prospective and consecutive samples were taken of the external intercostal muscle (fifth space, anterior axillary line) in 15 patients with chronic obstructive pulmonary disease (mean [SD] age 66 [6] years; forced expiratory volume in 1 second 49% [9%] of predicted; PaO₂ 75 [9] mm Hg). Samples were taken during TLL (8 patients, all with pulmonary neoplasms but carefully selected in order to rule out systemic effects) or TA (7 patients). Patients with serious comorbidity were excluded from the second group. Samples were processed for structural analysis of fibers (immunohistochemical and enzymatic histochemical) and genetic expression of TNF- α and IGF-1 (real-time polymerase chain reaction).

RESULTS: No differences in the structure of fibers were found between the 2 groups. No differences were observed in the expression of TNF- α or IGF-1.

CONCLUSIONS: Using rigorous criteria, the TLL method appears to be suitable for studying the structural characteristics and expression of inflammatory cytokines and growth factors in the external intercostal muscle. Moreover, it can also be inferred that TLL is probably also useful for obtaining samples of the diaphragm, a muscle which cannot currently be sampled by any alternative method.

Key words: *Respiratory muscles. Fibers. TNF- α . Growth factor. Thoracotomy.*

Introducción

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una entidad de elevada prevalencia, que ocasiona un elevado gasto sanitario¹. Funcionalmente se caracteriza por la presencia de obstrucción no reversible al flujo aéreo e insuflación pulmonar². Esta segunda ocasiona cambios en la geometría del tórax, cuya principal consecuencia es la elongación de los músculos intercostales y el acortamiento del diafragma. Los músculos se alejan así de su longitud óptima de contracción y ven reducida su capacidad funcional³. A esto se añade que deben trabajar ante cargas elevadas, y en presencia de deterioro en las relaciones de ventilación/perfusión pulmonares, lo que contribuye al desequilibrio entre ofertas y demandas de oxígeno y nutrientes al músculo. Sin embargo, a pesar de los efectos perjudiciales de factores “externos” al propio músculo respiratorio, estudios estructurales han permitido definir la presencia de adaptación “intrínseca” de éste^{4,5}. Estos cambios se acompañan de una mayor capacidad de desarrollar fuerza⁶ y, probablemente, una mayor resistencia en sus fibras. Por otro lado, los músculos de los pacientes con EPOC parecen hallarse sometidos a otras influencias nocivas,

como el estrés oxidativo⁷ o la inflamación⁸. Aunque los modelos animales de exposición al tabaco o de enfisema por agresión física o química permiten emular algunas de las circunstancias presentes en la enfermedad, probablemente sean incompletos respecto al tiempo de exposición y coexistencia de factores que sí están presentes en los pacientes con EPOC. Todo lo mencionado hace que sea esencial poder estudiar la estructura y el metabolismo de los músculos respiratorios en seres humanos que presentan la enfermedad. Para ello, pueden obtenerse muestras musculares utilizando diversos modelos. En primer lugar, la toma de tejido en autopsias⁹. Sin embargo, este modelo no permite controlar los numerosos factores asociados a la muerte. En segundo lugar, la toma de muestras durante la cirugía de reducción de volumen pulmonar⁴, modelo que por razones éticas se ha visto radicalmente reducido en los últimos años¹⁰ y que sólo permite disponer de muestras de pacientes con enfermedad grave. En tercer lugar, la obtención de muestras en el curso de una toracotomía por lesión localizada (TLL)^{5,11,12}. Aquí el problema radica en la probable interferencia de factores asociados a la enfermedad de base, casi siempre una neoplasia. En cuarto lugar, la toma de biopsias durante laparotomía alta¹³. Lamentablemente, este tipo de intervención ha visto reducidas sus indicaciones de forma radical con el advenimiento de la cirugía por laparoscopia. Por todo ello, hace unos años se planteó la obtención de muestras de músculos respiratorios de la caja torácica –la llamada toracotomía ambulatoria (TA)–, en pacientes en régimen ambulatorio, que pueden ser cuidadosamente seleccionados en cada caso según el diseño del estudio¹⁴. Sin embargo, este modelo presenta un problema importante, ya que no permite obtener muestras del principal músculo respiratorio, el diafragma. La TLL ha sido el modelo de más amplia utilización, y probablemente sea adecuado para estudios morfométricos. Sin embargo, existe la duda razonable de que la enfermedad de base, que, como ya se ha mencionado, suele ser una neoplasia, pueda modificar el microambiente celular respecto de acontecimientos como la expresión de sustancias con actividad inflamatoria o factores de crecimiento. Tanto el modelo TLL como el TA (que permite excluir toda comorbilidad) tienen en común la posibilidad de obtener muestras del músculo intercostal externo. El presente estudio tiene como objetivo comparar las características fibrilares y de expresión genética de la principal citocina inflamatoria, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), y el principal factor de crecimiento muscular, el llamado insulina-like (IGF-1), en muestras de músculo intercostal externo obtenidas con ambos modelos.

Métodos

Población

Se incluyó en el estudio a un total de 15 pacientes con EPOC¹⁵: 8 diagnosticados de neoplasia pulmonar localizada y pendientes de toracotomía terapéutica, y 7 controles. Estos últimos eran pacientes con similar grado de afectación funcional, pero sin comorbilidad, y se les reclutó a partir de la consulta externa de neumología de nuestro hospital. Todos los

sujetos mantenían un grado aceptable de actividad física, sin que en ningún caso desarrollaran actividades adicionales específicas, como asistencia regular a un gimnasio o programas de rehabilitación respiratoria. Además, se hallaban en fase estable, con ausencia de descompensaciones en los 3 meses anteriores a su inclusión en el estudio. Con el fin de evitar sesgos debidos a factores de tipo hormonal, sólo se incluyó a pacientes varones en ambos grupos. Para evitar otras causas potenciales de sesgo, se excluyó a los sujetos con asma bronquial, enfermedades neuromusculares, endocrinológicas o cardiovasculares, insuficiencia respiratoria crónica (presión arterial de oxígeno menor de 60 mmHg en fase estable), desnutrición importante (índice de masa corporal menor de 20 kg/m² y/o proteínas séricas totales inferiores a 6,5 g/dl), enoismo (ingesta de alcohol superior a 80 g/día) o tratamientos con fármacos que potencialmente pudieran afectar la estructura o función musculares (fundamentalmente esteroides o betaagonistas sistémicos, esteroides inhalados a altas dosis, teofilina, antagonistas del calcio y diuréticos). El protocolo, diseñado para cumplir con la declaración de Helsinki para estudios en seres humanos, fue aprobado por el Comité de Ética y Ensayos Clínicos de nuestro centro. Todos los sujetos firmaron el correspondiente consentimiento informado, tras recibir amplia información sobre los propósitos del estudio y eventuales riesgos de las técnicas a utilizar.

Diseño

Estudio transversal, con estudio funcional y de las características musculares, llevado a cabo durante un período de 2 años.

El primer día, se interrogó y examinó a los candidatos de ambos grupos, tras lo cual se procedió a la evaluación nutricional y antropométrica para su inclusión definitiva en el estudio. Posteriormente se procedió a la evaluación de su función pulmonar convencional y fuerza de los músculos respiratorios.

Aproximadamente 5 días más tarde, se les realizó la biopsia, bien en el quirófano de cirugía torácica (modelo de toracotomía) o en nuestro laboratorio (modelo ambulatorio).

Con posterioridad se procesaron las muestras musculares de forma simultánea.

Técnicas

1. *Evaluación de la función pulmonar convencional y de la función de los músculos respiratorios.* A los pacientes se les practicó una espirometría forzada con prueba broncodilatadora (Datospir 92, Sibel, Barcelona), para posteriormente determinar los volúmenes pulmonares estáticos y resistencia de la vía aérea mediante pletismografía corporal (Masterlab, Jaeger, Würzburg, Alemania). La transferencia del monóxido de carbono se evaluó con un medidor de gases incorporado al mismo equipo, y se obtuvo además una muestra de sangre arterial para determinación de gases respiratorios (analizador ABL 330, Radiometer, Copenhagen, Dinamarca). También se evaluó la fuerza de los músculos respiratorios, mediante la determinación de las presiones inspiratoria y espiratoria máximas en la boca. Para ello se utilizó un manómetro con pieza bucal ocluable (Sibelmed-163, Sibel, Barcelona). Ambas presiones máximas se determinaron durante una maniobra estática, ejecutada desde volumen residual para la presión inspiratoria máxima, y desde capacidad pulmonar total para la presión espiratoria máxima. Para la espirometría, los valores pletismográficos, de transferencia y de presiones respiratorias se emplearon valores de referencia publicados para población caucásica mediterránea¹⁶⁻¹⁹.

2. *Biopsia muscular.* Modelo TLL. Se sometió a los pacientes a toracotomía bajo anestesia general. Tras la disección de

los planos superficiales de la pared en el quinto espacio intercostal del lado de la lesión, se procedió a la toma de la muestra del músculo intercostal externo, utilizando para ello tijeras de disección. A continuación se prosiguió con la intervención quirúrgica, con apertura de la cavidad pleural y subsiguiente colapso pulmonar.

– Modelo TA. Tras administración local de anestesia (lido-caína al 5%), se tomaron muestras del músculo intercostal externo, también en el quinto espacio intercostal, línea axilar anterior, según la técnica anteriormente descrita por nuestro grupo¹⁴. En cada caso se escogió el hemitórax a intervenir de forma aleatorizada. La técnica de obtención de la muestra se inició con incisión cutánea y disección por planos hasta localizar el músculo. A continuación se instilaron unas gotas de lidocaína al 2%, tras lo cual se procedió a la toma de muestra con tijeras de disección.

El tamaño de las biopsias fue de aproximadamente 5 × 5 × 5 mm, y se procedió en el mismo lugar de obtención a su división en 3 partes. La primera de ellas se transfirió a un criovial, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a –80 °C hasta su utilización en el análisis de la expresión de TNF-α e IGF-1. La segunda parte fue embebida en OCT, congelada en isopentano enfriado en nitrógeno líquido y posteriormente cortada en micrótomos (Cry-cut 2800N, Reichert-Jung, Nusslock, Alemania) en cortes de 6 μm de espesor, adherida a un portaobjetos mediante gelatina alumbre Cr, y utilizada en la técnica de histoquímica enzimática. La tercera fue sumergida en formaldehído, incluida en parafina, cortada en micrótomos en secciones de 3 μm, montada en un portaobjetos pretratado con 3-amino-propiltriethoxisilano y empleada en la técnica de inmunohistoquímica.

Análisis de los porcentajes y tamaños fibrilares

Se realizó mediante las técnicas de inmunohistoquímica e histoquímica enzimática, con posterior análisis morfométrico. Para la primera, las muestras se tiñeron con hematoxilina para confirmar la correcta orientación fibrilar y valorar las características generales del músculo. Posteriormente se utilizaron anticuerpos monoclonales contra las isoformas I y II de las cadenas pesadas de miosina (MyHC) (Biogenesis, New Fields, Poole, Reino Unido). La unión antígeno-anticuerpo se detectó con el método tradicional de avidina-biotina-inmunoperoxidasa. Se obtuvieron los correspondientes controles negativos por omisión del primer anticuerpo. Realizado el marcaje de los tipos celulares, se procedió al análisis morfométrico, realizado en un microscopio óptico (Olympus, Series BX50F3, Olympus Optical Co., Hamburgo, Alemania), conectado a un sistema de digitalización de imagen (Visual Communication Suite, Pixera Studio versión 2.0, Pixera Corporation, Los Gatos, CA, EE.UU.). Los porcentajes de los diferentes tipos celulares y la evaluación del tamaño fibrilar se realizaron en al menos 100 fibras por muestra, utilizando un programa de acceso libre de los National Institutes of Health de EE.UU. (NIH Image, versión 1.60, Bethesda, MAR, EE.UU.).

Para la histoquímica enzimática (técnica de ATPasas), se procedió a la incubación en solución de 0,1 M de veronal sódico, 0,10 M de cloruro cálcico y agua destilada, durante 15 min y a temperatura ambiente. La solución se ajustó a 3 pH diferentes (9,4, 4,6 y 4,2). Posteriormente, las muestras se incubaron durante 45 min en una solución similar a la inicial, pero con sal disódica de ATP, y también ajustada en sus pH. Más tarde, se procedió al lavado sucesivo en cloruro cálcico, cloruro de cobalto, veronal sódico, agua destilada, sulfuro amónico y, nuevamente, agua destilada. Se procedió entonces a la deshidratación con concentraciones progresivas de alcohol y a un baño final con xilol.

Análisis de la expresión de los genes de TNF- α e IGF-1 en el músculo

Se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en su variedad de "tiempo real". Para ello se procedió a la extracción del ácido ribonucleico (ARN), retro-transcripción y posterior reacción en cadena de la polimerasa.

La extracción de ARN se efectuó mediante la técnica de TRIzol (Life Technologies, Grand Island, NY, EE.UU.). De forma breve, de 15 a 50 mg de tejido se homogeneizaron en 1 ml de TRIzol, posteriormente se añadieron 200 μ l de cloroformo y se agitó la muestra de forma vigorosa durante 15 s, tras lo cual se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación, las muestras se centrifugaron a 12.000 g durante 15 min y a 4 °C, y se transfirieron 400 μ l del sobrenadante acuoso a un nuevo tubo. Posteriormente, se precipitó el ARN mediante la adición de isopropanol y la muestra resultante se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Se procedió entonces a una nueva centrifugación a 12.000 g y 4 °C. El ARN resultante fue lavado con etanol al 70% y secado mediante aire, para ser resuspendido en agua libre de ARNasas. A continuación se determinó el ARN de la muestra por espectrofotometría, y ésta se almacenó a -80 °C hasta la realización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.

Para la síntesis del ADNc se transcribió inversamente 1 μ g de ARN total en una reacción de 10 μ l, usando un cebador oligo(dT)¹²⁻¹⁸ y transcriptasa inversa (Superscript II, Invitrogen, Life Technologies). Tras la fase de anillado durante 10 min a 70 °C, se realizó la transcripción inversa a 42 °C durante 50 min. El proceso fue interrumpido y la temperatura subió a 70 °C durante 10 min. Todo el proceso se realizó con el sistema GeneAmp PCR (Perkin Elmer, Richmond, VA, EE.UU.).

La amplificación se realizó en alícuotas de 1/50 del ADNc resultante en la fase anterior, con un detector de secuencia (ABI PRISM 7900HT, Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). La expresión de TNF- α e IGF-1 se cuantificó con 2 ensayos pre-revelados (Taqman Assays-on-Demand Gene Expression Products, Applied Biosystems). Se escogieron los cebadores en 2 axones diferentes para cada gen con el objetivo de evitar la contaminación con ADN genómico y se marcaron con FAM (6-carboxifluoresceína) en la terminación 5' y con TAMRA (6-carboxitetrametil-rodamina) en la terminación 3'. El ADNc de la beta-actina se utilizó como control interno para normalizar las diferencias en la cantidad de ADNc total en cada muestra. Éstas se analizaron por triplicado en

una placa de 384 pocillos (Applied Biosystems). Las reacciones se realizaron con 1 μ l de ADNc, 10 μ l 2 \times de la mezcla maestra TaqMan, 900 nM de cada uno de los cebadores y 250 nM de la sonda fluorescente. La mezcla se incubó a 50 °C durante 2 min para la descontaminación con AmpErasa uracil-N-glucosilasa. A continuación, se activó la ADN-polimerasa AmpliTaq Gold mediante un aumento de temperatura a 95 °C durante 10 min. Finalmente se realizaron 50 ciclos de amplificación, consistentes en la desnaturalización a 95 °C durante 15 s y anillado-extensión a 60 °C durante 1 min. Los resultados se procesaron con un programa específico (Sequence Detector Software 2.1, Applied Biosystems). Cada gen-problema se comparó con el ADNc de calibración. Los valores promedio de cada gen-problema se normalizaron respecto a la referencia endógena (beta-actina) en ciclo umbral (CT, threshold cycle), obteniéndose el valor de Δ CT. A este valor se le sustrajo el Δ CT del ADNc de calibración y se obtuvo el valor de $\Delta\Delta$ CT. El número de copias para cada ADNc se calculó con la expresión $2^{-(\Delta\Delta CT)}$. Se utilizaron los valores medios resultantes en cada caso, aunque sólo se aceptaron para el cálculo resultados con diferencias inferiores al 5%.

Análisis estadístico

Las variables se muestran como media \pm desviación típica. Las diferencias entre ambos grupos se han analizado mediante la prueba no paramétrica de la U de Mann-Whitney, mientras que las eventuales correlaciones entre diferentes variables se han evaluado con el coeficiente de Spearman. En todos los casos se ha establecido el nivel de significación en valores de p inferiores a 0,05.

Resultados

Las características generales de los pacientes incluidos en ambos grupos aparecen en la tabla I. Fundamentalmente se trataba de sujetos con correcto estado nutricional, pero afectación pulmonar moderada-grave, caracterizada por importante obstrucción al flujo aéreo e insuflación pulmonar, moderada afectación del intercambio de gases y reducida fuerza muscular respiratoria.

Las características fibrilares del músculo intercostal externo fueron similares en ambos grupos de pacientes (figs. 1 y 2), con discreto predominio de las fibras de tipo

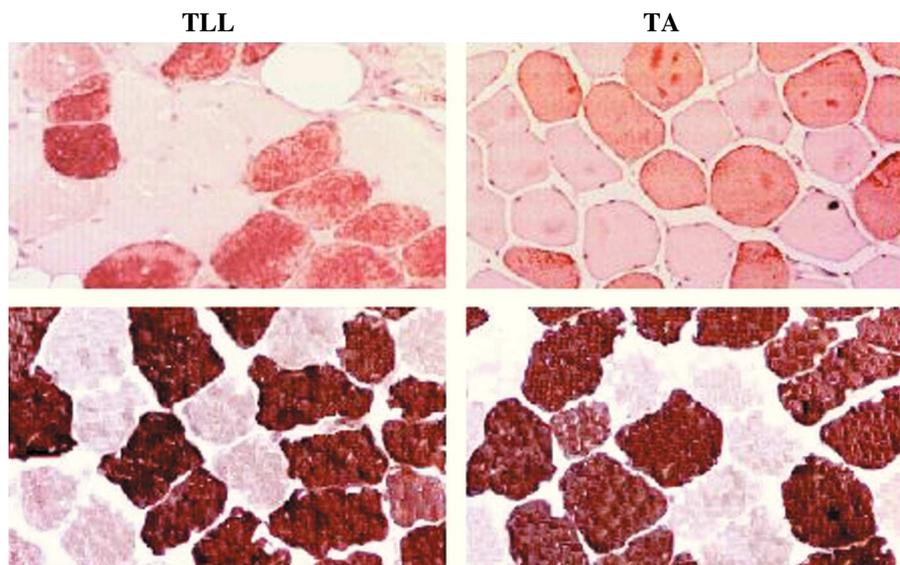


Fig. 1. Cortes transversales de preparaciones musculares de muestras obtenidas por los modelos de toracotomía por lesión localizada (TLL) y toracotomía ambulatoria (TA). A: técnica de inmunohistoquímica, con identificación de anticuerpos contra la isoforma I de las cadenas pesadas de miosina. B: técnica de ATPasas (histoquímica enzimática).

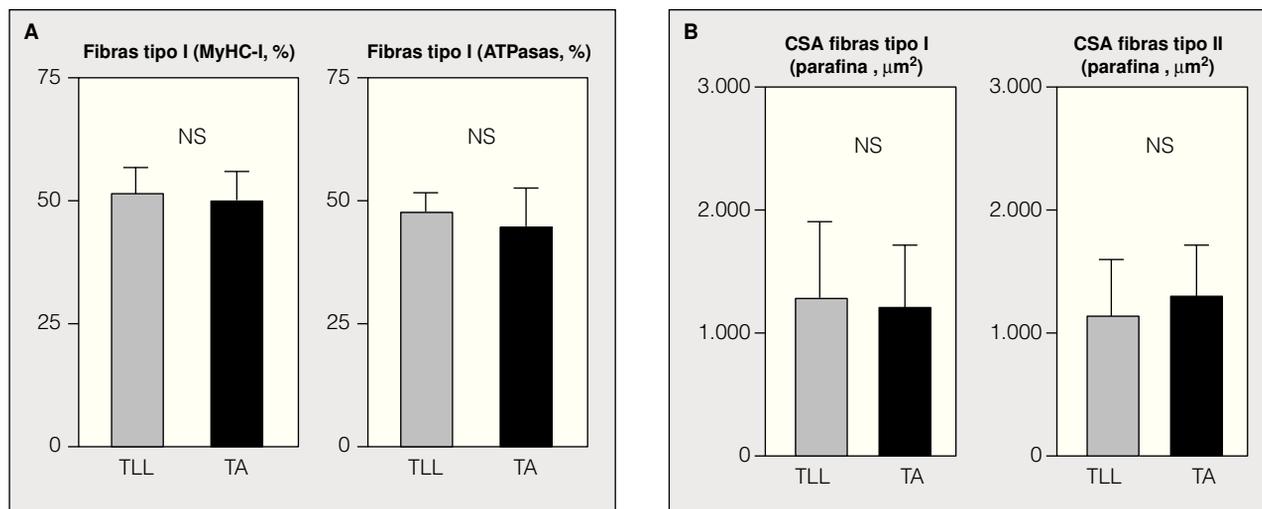


Fig. 2. A: porcentajes de fibras oxidativas obtenidas por las técnicas de inmunohistoquímica e histoquímica enzimática en músculos procedentes de los 2 modelos incluidos en el estudio (anticuerpos monoclonales contra la isoforma I de las cadenas pesadas de miosina o MyHC y ATPasas). B: tamaños celulares fibrilares en las muestras incluidas en parafina. CSA: área de sección transversal. NS: no significativo; TA: toracotomía ambulatoria; TLL: toracotomía por lesión localizada.

TABLA I
Características de los pacientes incluidos en el estudio

	TLL	TA
N.º de pacientes	8	7
Edad (años)	68 ± 5	64 ± 6
Peso (kg)	74 ± 11	79 ± 7
IMC (kg/m ²)	25 ± 3	27 ± 3
FEV ₁ (ml)	1.575 ± 416	1.671 ± 375
FEV ₁ (% ref.)	47 ± 9	50 ± 10
FEV ₁ /FVC (%)	61 ± 13	66 ± 9
RV/TLC (%)	5 ± 7	55 ± 6
DLCO (% ref.)	74 ± 15	70 ± 19
PIM (% ref.)	62 ± 12	65 ± 14
PEM (% ref.)	74 ± 13	71 ± 16
PaO ₂	73 ± 7	77 ± 11
PaCO ₂	37,2 ± 4,4	39,2 ± 1,9

En ninguna de las variables se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos. DLCO: transferencia de CO; FEV₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; FVC: capacidad vital forzada; IMC: índice de masa corporal; PaCO₂: presión parcial de anhídrido carbónico en sangre arterial; PaO₂: presión parcial de oxígeno en sangre arterial; PEM: presión espiratoria máxima en boca; PIM: presión inspiratoria máxima en boca; RV: volumen residual; TA: toracotomía ambulatoria; TLC: capacidad pulmonar total; TLL: toracotomía por lesión localizada.

oxidativo en las 2 técnicas de tipificación utilizadas (inmuno-histoquímica y ATPasas). En cuanto al tamaño, tampoco mostró diferencias entre los intercostales obtenidos por uno u otro procedimiento (TLL y TA), manteniendo en ambos casos áreas de sección que pueden considerarse dentro de la normalidad. Debe señalarse aquí que las áreas referidas se han determinado en muestras incluidas en parafina. Éstas son algo menores que las que pueden obtenerse en muestras congeladas y embebidas en OCT, debido al resultado final de factores contrapuestos e inherentes a ambas técnicas; en concreto, cierta deshidratación en las primeras y la presencia frecuente de artefactos de congelación en las segundas. En general, y con un procesamiento correcto en ambas, la segunda tiene un coeficiente de corrección que (en nuestro laboratorio) oscila entre 1,3 y 1,6.

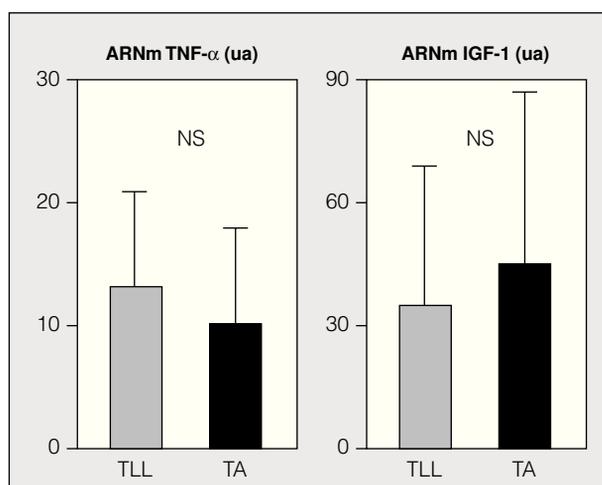


Fig. 3. Valores correspondientes a la expresión de los genes del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y factor de crecimiento muscular insulina-like (IGF-1) en las muestras de músculo intercostal externo obtenidas por toracotomía por lesión localizada (TLL) y toracotomía ambulatoria (TA) en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica. NS: no significativo; ua: unidades arbitrarias.

En cuanto a la expresión de los genes del TNF- α y el IGF-1, también fue similar en ambos grupos de pacientes (fig. 3), sin que se apreciaran correlaciones de interés con los hallazgos estructurales.

Dadas las características de relativa homogeneidad funcional y nutricional en las poblaciones estudiadas, no se hallaron correlaciones significativas de interés entre ese tipo de variables y las características estructurales o de expresión en el músculo.

Discusión

Este trabajo refuerza el uso del modelo de TLL para la obtención y evaluación de muestras musculares respiratorias en pacientes con EPOC. Al hecho esperable de

que, tras un cuidadoso proceso de selección, la enfermedad de base no afecte el fenotipo fibrilar, se añade la ausencia de efectos detectables en la expresión local de TNF- α e IGF-1. Esto hace pensar que las muestras obtenidas con el modelo TLL pueden ser tan útiles como las conseguidas por TA en el estudio de procesos como la expresión local de citocinas o de factores de crecimiento en los músculos respiratorios. Además, la falta de diferencias observada entre los intercostales obtenidos con una u otra técnica permite aventurar la probable validez de los estudios realizados en muestras de diafragma, previamente obtenidas por TLL.

Es conocido que los músculos respiratorios de los pacientes con EPOC son capaces de desarrollar mayor fuerza incluso que los de sujetos sanos, cuando los segundos se hallan a volúmenes pulmonares similares a los que padecen los primeros⁶. Esto indujo a pensar en la existencia de adaptaciones, estructurales y metabólicas, en los músculos respiratorios de los pacientes con EPOC. Adaptaciones que contrarrestarían en parte los efectos perjudiciales del aumento de cargas, los cambios en la geometría muscular (con alejamiento de la longitud óptima de contracción) y el eventual desequilibrio entre aporte y demanda de nutrientes al músculo.

Sin embargo, la toma de muestras de los músculos respiratorios, susceptibles de estudios estructurales o de expresión proteica, choca con una serie de dificultades inherentes a los modelos a utilizar. En primer lugar, y como se ha mencionado en la introducción, se utilizó el modelo de toma de muestras en cadáveres^{9,20}. Este modelo se ha ido abandonando progresivamente pues, aunque puede ser útil para estudios de propiedades muy estáticas (p. ej., los porcentajes fibrilares), no permite evaluar numerosos procesos, susceptibles de cambios ante factores que pueden acompañar a la muerte biológica. Tampoco es posible definir con certeza en la mayoría de los casos si el paciente presentaba o no una EPOC y el grado de afectación funcional previo al fallecimiento. Además, no siempre es posible descartar o conocer con precisión la eventual comorbilidad. Un modelo alternativo a la necropsia es la obtención de muestras en el curso de toracotomía por lesión pulmonar localizada. Éste es el modelo que se ha empleado con más frecuencia^{5,11,12,21-23} y tiene indudables ventajas. Por un lado, permite la obtención de cualquier músculo respiratorio que se desee estudiar. Por otro, se puede disponer de un diagnóstico preciso de la enfermedad pulmonar, incluidos la función y el estado del parénquima. Además, la TLL permite disponer de músculos respiratorios de sujetos con función pulmonar normal. Sin embargo, también presenta limitaciones. La más importante, la derivada de la presencia de comorbilidad no susceptible de exclusión, y que deriva de la enfermedad que motivó la indicación quirúrgica, enfermedad que casi siempre es de tipo neoplásico. Aunque una cuidadosa selección de los pacientes permite descartar razonablemente la afección nutricional o paraneoplásica, no las excluye totalmente. Además, muchos pacientes susceptibles de TLL y con función pulmonar todavía en los límites amplios de lo que consideramos normalidad han sido fumadores (de ahí su neoplasia pulmonar), por lo que su con-

sideración de “controles” es desde una óptica puramente de mecánica pulmonar. Es decir, es posible que presenten ya alteraciones tempranas en sus músculos, asociadas al hábito tabáquico y/o a estadios iniciales de la enfermedad, cuando aún no se han modificado de forma sustancial las variables funcionales pulmonares.

El siguiente modelo propuesto fue el de biopsia muscular durante la toracotomía para reducción de volumen pulmonar⁴. Este modelo puede ser de utilidad en muchos casos, al permitir la exclusión de comorbilidad importante. Además, puede permitir el estudio logitudinal de los efectos de la propia intervención sobre la estructura de los músculos de la caja torácica, mediante una segunda biopsia transcurrido un tiempo desde la cirugía. Sin embargo, presenta 3 problemas fundamentales. Por un lado, no permite disponer de sujetos con función pulmonar normal o afectación leve o moderada, lo que impide disponer de grupo control y estudiar la progresión de afectaciones musculares en los diversos grados de la enfermedad. Además, en la mayoría de centros los pacientes son sometidos a programas de rehabilitación previos a la cirugía, lo que distorsiona probablemente muchos de los hallazgos ligados al condicionamiento o desacondicionamiento muscular. Así se ha visto que la rehabilitación respiratoria, y en concreto el entrenamiento de los músculos ventilatorios, induce cambios en sus propiedades fibrilares y en la expresión de citocinas inflamatorias²⁴. Además, tras un análisis detallado de los resultados de la cirugía de reducción pulmonar¹⁰, la mayoría de programas se han reducido drásticamente, lo que dificulta la obtención de muestras al tiempo que abre importantes interrogantes éticos.

También se ha propuesto, aunque únicamente en el plano teórico, la obtención de muestras en pacientes con EPOC grave sometidos a trasplante pulmonar. Sin embargo, es fácil descartar este modelo por las importantes implicaciones de sesgo que comporta el tratamiento inmunodepresor de sostén.

Las limitaciones mencionadas nos indujeron hace unos años al desarrollo de un nuevo modelo, basado en la obtención de muestras por laparotomía alta¹³. Tras el desarrollo de una técnica quirúrgica que superara el principal problema técnico²⁵, la provocación de un neumotórax iatrógeno, este método se presentó como prometedor, al permitir descartar la presencia de comorbilidad importante. Sin embargo, en la práctica se ha mostrado menos efectivo, al haber disminuido drásticamente las indicaciones de la propia laparotomía. Esto es debido a su creciente sustitución por la cirugía laparoscópica, de riesgos menores y costes reducidos. En realidad, la laparotomía ha quedado prácticamente restringida a las intervenciones de urgencia y cirugía de las neoplasias. En el primer caso, las frecuentes circunstancias de hemorragia o perforación hacen difícil la obtención de muestras, y aun disponiendo de ellas es discutible considerarlas válidas. En el segundo caso, vuelve a aparecer el problema de comorbilidad importante por la enfermedad de base.

A partir de estas premisas, nuestro grupo desarrolló también un modelo para la obtención de muestras en pacientes que pudieran ser previamente seleccionados

según el diseño ideal del estudio^{14,26}. Este modelo, la TA, es mínimamente invasivo, puede realizarse en pacientes en régimen ambulatorio y permite obtener muestras de diferentes músculos respiratorios, como los intercostales o el oblicuo externo. Además, se pueden realizar estudios de intervención, con tomas repetidas de muestras en el mismo sujeto²⁴, al haberse demostrado la identidad fenotípica entre los lados dominante y no dominante del tórax a ese nivel¹⁴. Tiene, sin embargo, un problema importante, ya que no es posible acceder al principal músculo respiratorio, que es el diafragma.

Tras este análisis parece obvio que el modelo más adecuado para la obtención de cualquier músculo respiratorio, incluido el diafragma, sería el de TLL. Queda sin embargo en el aire la duda de si, con una cuidadosa selección de pacientes para excluir factores de interferencia, este modelo es efectivamente válido para describir los cambios que se producen en los músculos en el curso de la EPOC. Esto es de especial interés en la actualidad, cuando las características fenotípicas de los músculos respiratorios en esa enfermedad parecen ya bien definidas y el objetivo está más centrado en el estudio de otras propiedades como la presencia de estrés oxidativo^{7,27,28}, la expresión local de citocinas⁸, la apoptosis²⁹ o la expresión de factores de crecimiento³⁰. Un posible abordaje de esta pregunta es el análisis de algunos de estos factores en muestras de un músculo susceptible de biopsia tanto con el modelo TLL como con aquel que permite la exclusión de toda comorbilidad, es decir, el TA. Éste es el caso del intercostal externo, músculo respiratorio que, aunque no es el principal, desempeña un papel relevante en la respiración, sobre todo cuando aumentan las cargas o las necesidades del sistema³¹⁻³³. Si existe una discrepancia en el fenotipo fibrilar entre los modelos de TLL y TA, deberán ponerse en cuestión algunos de los resultados ya publicados y considerados ciertos. Si la discrepancia afecta a la expresión de citocinas o factores de crecimiento, deberán buscarse nuevos modelos de obtención de muestras si se quiere definir cuál es la situación en los pacientes con EPOC, o bien realizar inferencias a partir de modelos animales de esta enfermedad. Si por el contrario los resultados son similares con ambos métodos, quedarán confirmados los hallazgos realizados con el modelo de TLL sobre el fenotipo fibrilar de los músculos respiratorios y podrán plantearse además estudios futuros sobre otros fenómenos como los antes mencionados. Además, y de forma indirecta (ya que no es el músculo analizado aquí), quedará reforzado el uso de diafragmas obtenidos por TLL en dicho tipo de estudios.

Nuestros resultados, muy similares con ambos modelos, permiten afirmar que podemos fiarnos de los resultados de estudios estructurales obtenidos en músculos procedentes de TLL. Además, aunque debería ampliarse el número de sustancias analizadas en estudios posteriores, probablemente también sean válidos en lo que hace referencia a expresión de citocinas y factores de crecimiento. Como se ha hipotetizado antes, esto sería válido no sólo para el propio músculo intercostal externo, sino muy probablemente también para el diafragma, ya que parece demostrarse la poca

influencia que la enfermedad de base tendría en las características musculares.

Las propiedades estructurales de las fibras son el principal factor que influye en las propiedades estructurales del músculo. Así, las fibras de contracción rápida y metabolismo anaerobio, fibras tipo II que expresan predominantemente MyHC-II, son capaces de producir fuertes contracciones durante un período limitado³⁴. Por el contrario, las fibras de contracción lenta y metabolismo principalmente aerobio, fibras tipo I con predominio de MyHC-I, son más resistentes a la fatiga pero su potencia contráctil es menor³⁴. El tamaño fibrilar también influye de forma directa en la fuerza de contracción. De forma genérica podríamos decir que un músculo con fibras mayores (sobre todo si son las de tipo II) y con mayor proporción de fibras tipo II desarrollará más fuerza contráctil³⁴.

El TNF- α es una citocina proinflamatoria con acciones múltiples. Por un lado, promueve activamente la respuesta inmunitaria y antitumoral, puede inducir angiogénesis y contribuye a la proliferación y migración celulares en condiciones adecuadas³⁵. Por otro, su incremento puede provocar efectos deletéreos como la disminución en la síntesis de proteínas estructurales (p. ej., las propias MyHC), el aumento del catabolismo, la inducción de apoptosis o la inhibición directa de la contractilidad muscular³⁶. Además, el TNF- α se halla íntimamente ligado a la presencia de estrés oxidativo y nitrosativo, ambos presentes en los músculos de pacientes con EPOC⁷. Esta citocina puede en realidad actuar como un factor sistémico (efecto endocrino), sintetizada por diversas células del sistema inmunitario o por la grasa corporal, o también como un factor de actuación local (efectos paracrino y autocrino), al ser sintetizada por el propio músculo³⁷. El TNF- α ha sido implicado en la pérdida de masa y función muscular que acompaña a diversos procesos, entre los que se encuentran el envejecimiento, la sepsis, la EPOC y el cáncer. Un factor fundamental en su expresión en el músculo sería el grado de actividad precedente. Así, recientemente hemos demostrado que el envejecimiento, ligado a un aumento sostenido de actividad por cambios en las propiedades mecánicas del sistema respiratorio, produce la infraexpresión de este factor en los músculos ventilatorios de personas mayores³⁸. Por el contrario, el ejercicio vigoroso provocaría la sobreexpresión local de TNF- α , aun en individuos sanos³⁹. El tema es todavía objeto de discusión, ya que otros autores no han podido observar dicho incremento ni en sujetos sanos ni en pacientes con EPOC tras ejercicios de intensidad moderada, al menos en los músculos de las extremidades⁸. Probablemente, estas discrepancias se deban a la situación previa del músculo (entrenado frente a desacondicionado), o a la intensidad del ejercicio.

El IGF-1 es probablemente el principal factor de crecimiento muscular, y se ha involucrado tanto en fenómenos de reparación como de crecimiento⁴⁰. Como en el caso del TNF- α , sus acciones pueden ser de tipo endocrino (fundamentalmente debidas al IGF-1 sintetizado en el hígado y distribuido por todo el organismo) o bien autocrino-paracrino, que serían las que ejerce el IGF-1

sintetizado en el propio músculo⁴⁰. De este último existen en realidad 2 isoformas, muy similares estructuralmente, pero con regulación diferenciada: el IGF-1 clásico (llamado IGF-IEa), con acciones similares al sistémico, y el denominado factor de crecimiento mecánico (MGF o IGF-IEc)⁴¹. Este último parece clave en la activación de genes ligados a las proteínas estructurales en respuesta al estímulo mecánico, mientras que el clásico respondería más a señales de tipo químico. El IGF-1 y el TNF- α se hallan además relacionados (*cross-talk*), pues el primero parece inhibir la activación del factor nuclear κ B, inducido a su vez por el segundo⁴².

En los 3 casos –estructura fibrilar, expresión de TNF- α y expresión de IGF-1– los modelos de TLL y TA se han mostrado como superponibles en el presente estudio en cuanto al músculo intercostal externo.

El presente trabajo presenta 2 limitaciones relativas. La primera está relacionada con el número de sustancias cuya expresión se ha analizado. Éste es ciertamente reducido. Aunque el número de sustancias potencialmente susceptibles de análisis es casi ilimitado, se decidió centrar el estudio en 3 aspectos: la estructura fibrilar básica y la expresión de sendos representantes de las familias de citocinas y factores de crecimiento, en el primer caso, para verificar la bondad de la mayoría de los datos ya recogidos por la biliografía; en el segundo y tercero, para tener una idea de la situación respecto a esos tipos de sustancias, de gran interés en las investigaciones que tienen lugar en la actualidad. Sin embargo, y a pesar de nuestros resultados, parece aconsejable realizar estudios de expresión más amplios en el futuro. La segunda limitación es la de no haber podido estudiar muestras del principal músculo respiratorio, el diafragma, obtenidas con el modelo TLL y con otro que permitiera excluir comorbilidad. Sin embargo, las características y limitaciones de todos los modelos existentes en la actualidad no permiten ese tipo de diseño. Por otra parte, nuestros resultados en el músculo intercostal permiten inferir que, probablemente, la situación sea similar en el diafragma, ya que los esperables efectos sistémicos de la enfermedad de base deberían influir de forma paralela en ambos músculos.

Como conclusiones del presente trabajo confirmamos la bondad del modelo de TLL para la obtención de muestras de músculos respiratorios, tanto para estudios estructurales como, probablemente, para estudios de expresión de citocinas inflamatorias y factores de crecimiento.

Agradecimiento

A Àngela Roig y Núria Soler por su asistencia técnica en el laboratorio de pruebas funcionales respiratorias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mira vitlles M, Murio C, Guerrero T, Gisbert R. Costs of chronic bronchitis and COPD: a 1-year follow-up study. *Chest* 2003;123:784-91.
2. Montemayor T, Alfajeme I, Escudero C, Morera J, Sánchez Agudo L. Guías para el diagnóstico y tratamiento de la EPOC. Grupo de trabajo de la SEPAR. Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica. *Arch Bronconeumol* 1996;32:285-301.
3. McCully KK, Faulkner JA. Length-tension relationship of mammalian diaphragm muscles. *J Appl Physiol* 1983;54:1681-6.
4. Levine S, Kaiser L, Lefterovich J, Tikunov B. Cellular adaptations in the diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 1997;337:1799-806.
5. Orozco-Levi M, Gea J, Lloreta J, Félez M, Minguella J, Serrano S, et al. Subcellular adaptation of the human diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999;13:371-8.
6. Similowski T, Yan S, Gauthier AP, Macklem PT, Bellemare F. Contractile properties of the human diaphragm during chronic hyperinflation. *N Engl J Med* 1991;325:917-23.
7. Barreiro E, Gea J, Corominas JM, Hussain SH. Oxidative stress and nitric oxide production in the quadriceps femoris muscle of COPD patients [en prensa]. *Am J Respir Cell Mol Biol*.
8. Rabinovich RA, Figueras M, Ardite E, Carbó E, Troosters T, Filella X, et al. Increased tumour necrosis factor-alpha plasma levels during moderate-intensity exercise in COPD patients. *Eur Respir J* 2003;21:789-94.
9. Mizuno M, Secher NH. Histochemical characteristics of human expiratory and inspiratory intercostal muscles. *J Appl Physiol* 1989;67:592-8.
10. Koebe HG, Kugler C, Dienemann H. Evidence-based medicine: lung volume reduction surgery (LVRS). *Thorac Cardiovasc Surg* 2002;50:315-22.
11. Orozco-Levi M, Lloreta J, Minguella J, Serrano S, Broquetas JM, Gea J. Injury of the human diaphragm associated with exertion and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1734-9.
12. Hughes RL, Katz H, Sahgal V, Campbell JA, Hartz R, Shields TW. Fiber size and energy metabolites in five separate muscles from patients with chronic obstructive lung diseases. *Respiration* 1983;44:321-8.
13. Pasto M, Minguella J, Orozco-Levi M, Palacio J, Félez M, Broquetas J, Gea J. Obtención de muestras del diafragma humano en el curso de laparotomía alta. Análisis estructural. *Arch Bronconeumol* 2000;36:19-24.
14. Jiménez-Fuentes MA, Gea J, Pallas O, Gallego F, Félez MA, Broquetas JM. Morfometría fibrilar en el músculo intercostal externo. Comparación entre los lados dominante y no dominante en pacientes con EPOC severa. *Arch Bronconeumol* 1998;34:189-93.
15. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:S78-S121.
16. Roca J, Sanchis J, Agustí-Vidal A, et al. Spirometric reference values from a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1986;22:217-24.
17. Roca J, Burgos F, Barberà JA, et al. Prediction equations for plethymographic lung volumes. *Respir Med* 1998;92:454-60.
18. Roca J, Rodríguez-Roisin R, Cobo E, et al. Single-breath carbon monoxide diffusing capacity prediction equations from a Mediterranean population. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:1026-32.
19. Morales P, Sanchis J, Cordero PJ, Dées JL. Presiones estáticas respiratorias máximas en adultos. Valores de referencia para una población mediterránea caucásica. *Arch Bronconeumol* 1997;33:213-9.
20. Thurlbeck WM. Diaphragm and body weight in emphysema. *Thorax* 1978;33:483-7.
21. Hards JM, Reid WD, Pardy RL, Pare PD. Respiratory muscle fiber morphometry. Correlation with pulmonary function and nutrition. *Chest* 1990;97:1037-44.
22. Mizuno M, Secher NH, Saltin B. Fibre types, capillary supply and enzyme activities in human intercostal muscles. *Clin Physiol* 1985;5:121-35.
23. Saulea J, Gea J, Orozco-Levi M, Corominas J, Minguella J, Aguar C, et al. Structure and function relationships of the respiratory muscles. *Eur Respir J* 1998;11:906-11.
24. Ramírez-Sarmiento A, Orozco-Levi M, Guell R, Barreiro E, Hernández N, Mota S, et al. Inspiratory muscle training in patients with chronic obstructive pulmonary disease: structural adaptation and physiologic outcomes. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1491-7.
25. Gea J, Hamid Q, Czaika G, et al. Expression of myosin heavy chain isoforms in the respiratory muscles following inspiratory resistive breathing. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1274-8.

CASADEVALL C, ET AL. ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y EXPRESIÓN DE LOS FACTORES DE NECROSIS TUMORAL Y CRECIMIENTO INSULINA-*LIKE* EN LOS MÚSCULOS RESPIRATORIOS DE PACIENTES CON EPOC. ¿SON VÁLIDAS LAS MUESTRAS OBTENIDAS EN EL CURSO DE UNA TORACOTOMÍA POR NEOPLASIA PULMONAR LOCALIZADA?

26. Aguar MC. Estructura y función de los músculos respiratorios en la EPOC: desarrollo de un modelo de biopsia ambulatoria [tesis doctoral]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona, 1995.
27. Rabinovich RA, Ardite E, Troosters T, Carbo N, Alonso J, González de Suso JM, et al. Reduced muscle redox capacity after endurance training in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1114-8.
28. Agustí A, Sauleda J, Morla M, Miralles C, Busquets X. Disfunción del músculo esquelético en la EPOC. Mecanismos celulares. *Arch Bronconeumol* 2001;37:197-205.
29. Agustí AG, Sauleda J, Miralles C, Gómez C, Togores B, Sala E, et al. Skeletal muscle apoptosis and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:485-9.
30. Barreiro E, Hameed M, Casadevall C, Harridge S, Orozco-Levi M, Goldspink G, et al. Mechano and insulin-like I growth factor gene expression in the costal diaphragm of severe COPD patients [resumen]. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167(Suppl):A834.
31. Buzinska K, Supinski G, Di Marco AF. Inspiratory action of separate external and paraesternal intercostal muscle contraction. *J Appl Physiol* 1989;67:1395-1400.
32. De Troyer A, Farkas GA. Linkage between parasternals and external intercostals during resting breathing. *J Appl Physiol* 1990;69:509-16.
33. Farkas GA, Decramer M, Rochester DF, De Troyer A. Contractile properties of intercostal muscles and their functional significance. *J Appl Physiol* 1985;59:528-35.
34. Gea J. Myosin gene expression in the respiratory muscles. *Eur Respir J* 1997;10:2404-10.
35. Gehr G, Gentz R, Brockhaus M, Loetscher H, Lesslauer W. Both tumor necrosis factor receptor types mediate proliferative signals in human mononuclear cell activation. *J Immunol* 1992;149:911-7.
36. Li YP, Reid MB. Effect of tumor necrosis factor-alpha on skeletal muscle metabolism. *Curr Opin Rheumatol* 2001;13:483-7.
37. Saghizadeh M, Ong JM, Garvey T, Henry RR, Kern PA. The expression of TNF-a by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J Clin Invest* 1996;97:1111-6.
38. Coronell C, Martínez-Llorens J, Ramírez-Sarmiento A, Orozco-Levi M, Barreiro E, Gea J. Cytokine expression at the external intercostal muscle of healthy human beings. Effects of aging, sex and an exhaustive exercise. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167(Suppl 1):A27.
39. Casadevall C, Coronell C, Barreiro E, Corominas JM, Orozco-Levi M, Gea J. Increase in the expression of the gene encoding TNF- α in the human external intercostal muscle following inspiratory loading. *Am J Respir Crit Care Med* 2004 (en prensa).
40. Harridge S. Ageing and local growth factors in muscle. *Scand J Med Sci Sports* 2003;13:34-9.
41. Goldspink G. Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. *J Anat* 1999;194:323-34.
42. Vallee S, Fouchier F, Bremond P, Briand C, Marvaldi J, Champion S. Insulin-like growth factor-1 downregulates nuclear factor kappaB activation and upregulates interleukin-8 gene expression induced by tumor necrosis factor alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;305:831-9.