

Obtención de muestras del diafragma humano en el curso de laparotomía alta. Análisis estructural*

M. Pastó^{a,b}, J. Minguella^c, M. Orozco-Levi^{a,b}, J. Palacio^b, M. Félez^a, J. Broquetas^a y J. Gea^{a,b}

^aServei de Pneumologia. Hospital del Mar. ^bUnitat de Recerca Respiratòria i Ambiental. IMIM. ^cServei de Cirurgia Toràctica. Hospital del Mar. Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) y Universitat Pompeu Fabra. Barcelona.

El diafragma parece presentar fenómenos estructurales adaptativos en la EPOC. Sin embargo, existen limitaciones para la obtención de muestras musculares, sobre todo en enfermos con afectación funcional grave.

OBJETIVO: Valorar la viabilidad de un nuevo modelo de obtención de muestras del diafragma, que permitiría el estudio estructural incluso en los pacientes mencionados, y estudiar si el tamaño de las fibras se relaciona con la gravedad de la enfermedad.

MÉTODOS: Se han estudiado 15 enfermos (de 57 ± 15 años de edad), tributarios de laparotomía por proceso abdominal localizado. En todos ellos se efectuaron pruebas funcionales respiratorias completas. Las muestras musculares fueron obtenidas durante el acto quirúrgico, mediante una nueva técnica, con formación de "bolsa de tabaco" y biopsia en cúpula, validada previamente en modelos animales. Posteriormente, las biopsias fueron procesadas para evaluar las proporciones y tamaños fibrilares (tinción de ATPasa a diferentes pH).

RESULTADOS: Los 15 pacientes presentaban un amplio espectro funcional (FEV_1 22-120% ref), que incluía 4 enfermos graves ($FEV_1 \leq 50\%$ ref). Todos ellos se hallaban eunutruidos y su función respiratoria mostraba un FEV_1/FVC del $67 \pm 13\%$, RV $134 \pm 55\%$ ref, y presiones máximas en la boca ($P_{Im_{max}}$) de -75 ± 27 cmH₂O y transdiafragmática ($P_{Idi_{max}}$) de 96 ± 26 cmH₂O, $DLco$ $87 \pm 26\%$ ref y PaO_2 89 ± 14 mmHg. En todos los pacientes fue posible la obtención de muestras válidas para el análisis estructural, con total ausencia de complicaciones. Las fibras presentaron un predominio ligero de las tipo I ($54 \pm 9\%$), que mantenían un tamaño globalmente normal (57 ± 9 μ m de diámetro mínimo o D_m , índice de atrofia de 195 ± 243 e índice de hipertrofia de 66 ± 78), sin diferencias entre ambos subtipos fibrilares (D_m de 58 ± 8 para las I y 61 ± 8 μ m para las II). Se observó una correlación inversa del tamaño global con los volúmenes estáticos (p. ej., D_m con RV , $r = -0,729$, $p < 0,01$).

CONCLUSIONES: La técnica laparoscópica descrita es sencilla y segura para su utilización en seres humanos, permitiendo obtener muestras del diafragma válidas para el estudio estructural. Esto permite ampliar el espectro de sujetos susceptibles de este tipo de estudios. Por otra parte, las fibras del músculo mencionado presentan un menor tamaño en relación con la gravedad de la afectación funcional asociada a la EPOC.

Palabras clave: Diafragma. Estructura muscular. Laparotomía.

(Arch Bronconeumol 2000; 36: 19-24)

*Trabajo financiado por el FIS, BIOMED, ARMAR y beca predoctoral para Residentes del IMAS.

Correspondencia: Dr. J. Gea Guiral.
Servei de Pneumologia. Hospital del Mar-IMIM.
Doctor Aiguader, 80. 08003 Barcelona.
Correo electrónico: jgea@imim.es

Recibido: 28-8-98; aceptado para su publicación: 7-9-99.

Human diaphragm specimens obtained during high laparotomy. Structural analysis

The diaphragm seems to undergo adaptive structural change in chronic obstructive pulmonary disease. The possibility of obtaining muscle specimens is limited, however, particularly when respiratory function is severely affected.

OBJECTIVE: To assess the viability of a new technique for obtaining diaphragm muscle samples appropriate for structural assessment even from patients with severe functional change, and to study the size of fibers in relation to severity of disease.

METHODS: Fifteen muscle specimens were obtained from patients (aged 57 ± 15 years) by abdominal laparotomy. All had undergone full lung function testing. Muscle samples were taken during surgery using a new technique involving formation of a tobacco pouch with dome biopsy. The method had been previously validated in animal models. Later, the biopsies were processed to evaluate fiber proportions and sizes (ATPase dyes at different levels of pH).

RESULTS: The 15 patients had a wide range of lung function results (FEV_1 22-120% ref); 4 were severely affected ($FEV_1 \leq 50\%$ ref). Nutritional status was normal in all cases; FEV_1/FVC was $67 \pm 13\%$, RV was $134 \pm 55\%$ ref, maximal mouth pressure ($P_{Im_{max}}$) was -75 ± 27 cmH₂O, transdiaphragmatic pressure ($P_{Idi_{max}}$) was 96 ± 26 cmH₂O, $DLCO$ was $87 \pm 26\%$ ref and PaO_2 was 89 ± 14 mmHg. We were able to obtain specimens valid for structural analysis from all patients with no complications. Light type I fibers predominated ($54 \pm 9\%$) and size was normal overall (57 ± 9 μ m minimum diameter [D_m] atrophy index 195 ± 243 , and hypertrophy index 66 ± 78), with no differences between the two fiber subtypes (D_m 58 ± 8 μ m for type I and 61 ± 8 μ m for type II). Overall size correlated inversely with static volumes (e.g. D_m with RV , $r = -0,729$, $p < 0,01$).

CONCLUSIONS: The laparoscopic technique described is simple and safe for use in humans to obtain diaphragm muscle specimens that are valid for morphometric analysis, allowing us to enlarge the range of subjects that can be enrolled for this type of study. The fiber muscles studied are smaller when functional involvement is greater in chronic obstructive pulmonary disease.

Key words: Diaphragm. Muscle structure. Laparotomy.

Introducción

Los músculos respiratorios (MR) de los pacientes con EPOC presentan alteraciones funcionales derivadas fundamentalmente de cambios en la mecánica respiratoria. Así, el aumento de los volúmenes pulmonares condiciona un cambio en la geometría del diafragma (Dfg),

que lo aleja de su longitud óptima de contracción¹. Sin embargo, se sabe que los pacientes con EPOC son capaces de desarrollar una fuerza incluso superior a los sujetos sanos, cuando unos y otros se encuentran a volúmenes pulmonares equivalentes², lo que hace suponer algún tipo de adaptación estructural. Estudios recientes parecen reforzar esta hipótesis, habiéndose observado que los pacientes con EPOC parecen presentar fibras menores, pero mayor número de capilares, superior porcentaje de fibras/isoformas de miosina resistentes a la fatiga y sarcómeros más cortos que los sujetos sanos³⁻⁷. Sin embargo, los modelos existentes para la obtención de muestras del Dfg tienen importantes limitaciones. Si las muestras proceden de cadáver^{8,9}, han podido deteriorarse o falta la evaluación funcional. Si se han obtenido en el curso de una toracotomía^{4,6,10-13}, faltan pacientes con afectación funcional grave o puede haber interferencias con la patología de base. Recientemente, Levine ha publicado una serie en que la muestra se obtuvo en el curso de cirugía de reducción del volumen pulmonar³. Este modelo amplía las posibilidades, pero limita necesariamente el número y características de los sujetos tributarios y no se halla disponible en todos los centros. Este estudio tiene un doble objetivo. Por un lado, valorar la viabilidad de una nueva técnica de abordaje del Dfg por laparotomía alta. La técnica, ya validada para el estudio estructural en modelos animales¹⁴, fue desarrollada parcialmente por miembros de nuestro grupo. Como objetivo colateral se ha querido analizar si existe relación entre la gravedad de la enfermedad pulmonar y el tamaño fibrilar en el Dfg. Este análisis había sido imposible hasta la fecha por la ausencia de pacientes graves en los estudios precedentes.

Métodos

Población

Se incluyeron 15 sujetos (57 ± 15 años) tributarios de laparotomía alta por lesión abdominal localizada. Sus característi-

cas generales, así como las causas de la intervención, aparecen en la tabla I. Se excluyeron los individuos con alteraciones nutricionales, enfermedades neuromusculares, cardiovasculares, endocrinometabólicas o respiratorias asociadas, así como todos aquellos con sospecha de síndromes paraneoplásicos, insuficiencia respiratoria crónica o tratamientos que pudieran modificar la fuerza o estructura musculares. El protocolo fue aprobado por el comité de ética de nuestra institución y todos los enfermos firmaron el pertinente consentimiento informado.

Evaluación del estado nutricional

Con el fin de evitar la inclusión de pacientes con alteraciones nutricionales se determinaron una serie de variables antropométricas y analíticas. Entre las primeras, el índice de masa corporal ($BMI = \text{peso}/\text{talla}^2$) y pliegue tricéptico. Este último se realizó en el tercio medio del brazo, con un medidor específico (Skinfold Caliper, Jamar, Ontario, Canadá). Entre los parámetros analíticos se determinaron las proteínas totales séricas, colesterol y tiempo de protrombina.

Pruebas funcionales respiratorias convencionales

Se realizaron una espirometría forzada con prueba broncodilatadora (Datospir 92; Sibel, Barcelona), determinación del volumen de gas intratorácico (ITGV o FRC) y resistencia de la vía aérea por pletismografía corporal (Masterlab, Jaeger, Würzburg, Alemania), determinación de la transferencia del monóxido del carbono (DL_{CO} , utilizando el medidor de gases incorporado al mencionado Masterlab). En todos los casos se emplearon valores de referencia para población mediterránea¹⁵⁻¹⁷. También se efectuó gasometría de sangre arterial (punción de la arteria radial, técnicas polarográficas convencionales, ABL 330, Radiometer, Copenhagen, Dinamarca).

Evaluación de la fuerza muscular periférica

Se determinó mediante un dinamómetro manual de tipo Collin (Herrera, Barcelona), considerándose como fuerza máxima la obtenida en la mejor de tres maniobras consecutivas, cuya diferencia fuera menor del 5%, en la mano no dominante.

TABLA I
Principales características de los pacientes

Paciente	Edad (años)	Causa de la laparotomía	FEV ₁ (% ref)	FEV ₁ /FVC (%)	RV (% ref)	Pib _{máx} (cmH ₂ O)	PIdi _{máx} (cmH ₂ O)	DL _{co} (% ref)	PaO ₂ (mmHg)	Fibras I (5)	Tamaño de las fibras Dm (µm)
1	34	Úlcus gástrico	110	80	124	-108	118	97	89	52	53
2	34	Úlcus gástrico	86	80	88	-85	ND	94	104	51	65
3	69	Neoplasia de colon	89	69	134	-71	58	80	87	48	48
4	57	Úlcus gástrico	74	69	149	-83	120	83	92	55	65
5	52	Úlcus duodenal	74	59	146	-84	65	94	89	58	53
6	45	Neoplasia de colon	98	82	36	-96	112	116	107	43	64
7	39	Poliposis familiar	96	78	66	-116	87	106	92	42	68
8	78	Neoplasia sigma	50	53	234	-40	93	56	91	63	43
9	67	Neoplasia de esófago	88	67	107	-85	ND	117	83	54	67
10	40	Estenosis pilórica	62	59	ND	-90	73	ND	107	51	52
11	67	Neoplasia de esófago	50	55	182	-50	ND	61	84	42	67
12	71	Neoplasia gástrica	84	70	127	-90	105	95	83	74	60
13	71	Litiasis biliar	22	47	156	-61	82	67	79	65	50
14	70	Úlcus gástrico	121	91	103	-45	141	99	81	58	61
15	58	Úlcus gástrico	35	50	231	-21	ND	38	65	54	44
X	57	-	76	67	134	-75	96	87	89	54	57
± DE	15	-	26	13	55	27	26	26	14	9	9

Pib_{máx}: presión inspiratoria máxima medida en boca; PIdi_{máx}: presión inspiratoria transdiafragmática máxima; DM: diámetro menor; ND: no disponible.

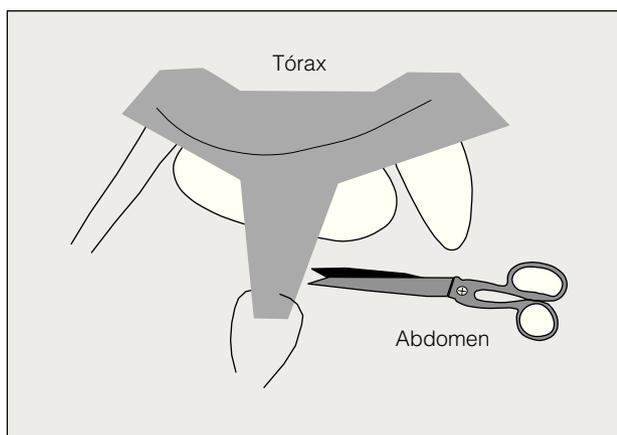


Fig. 1. Esquema de la técnica quirúrgica, con formación de la “bolsa de tabaco” previa a la toma de la muestra.

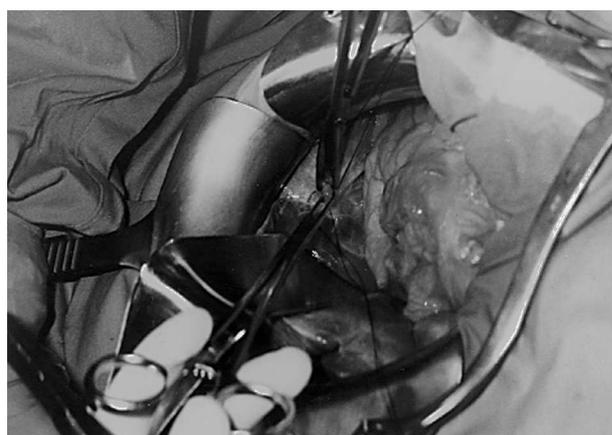


Fig. 2. Realización de la técnica: tracción y toma de la muestra.

Evaluación de la fuerza de los músculos respiratorios

Se determinaron las presiones máximas en boca ($PIb_{máx}$ según la versión española de la nueva propuesta de nomenclatura de la European Respiratory Society), esófago ($Ples_{máx}$) y estómago ($PIga_{máx}$). La $PIb_{máx}$ se obtuvo mediante maniobra de inspiración máxima desde un volumen cercano al residual y contra la vía aérea ocluida. El manómetro utilizado fue el Sibemed 163 (Sibel, Barcelona) y los valores de referencia, los descritos por Wilson¹⁸ para población europea. La $Ples_{máx}$ y la $PIga_{máx}$ se obtuvieron mediante la colocación en esófago y estómago de sendos catéteres con balón distal¹⁹ (Jaeger, Würzburg, Alemania). Cada catéter se conectó a un transductor de presión (Transpac II, Abbott, Chicago, Illinois, EE.UU.), y éste a un sistema digital de registro y análisis (Labview 3.0, National Instruments, Austin, Texas, EE.UU.). Las $Ples_{máx}$ y $PIga_{máx}$ se obtuvieron por inhalación brusca desde un volumen cercano a la FRC²⁰ (maniobra de *sniff*). La diferencia aritmética entre los valores de ambas permitió el cálculo de la presión transdiafragmática máxima ($PI_{di,máx}$).

Técnica quirúrgica (figs. 1 y 2)

Se siguió, con algunas modificaciones, la descrita por Szalazkin et al para la obtención de muestras del Dfg en estudios longitudinales y utilizando modelos animales¹⁴. La vía de acceso fue una laparotomía supraumbilical en todos los casos. Dada la novedad, se describe la técnica pormenorizadamente. En primer lugar, se procedió a la incisión de la pared abdominal y peritoneo, con colocación de un separador abdominal y tracción de la apófisis xifoidea. Esta maniobra permitió visualizar el diafragma izquierdo, procediéndose a la tracción suave de su región costal mediante pinza de Allis. Esta tracción se efectuó de forma sistemática a 5 cm del arco costal anterior ipsolateral en su línea media, generándose así una cúpula de convexidad abdominal. A continuación, se cerró dicha cúpula en “bolsa de tabaco”, lo que permitió prevenir el principal problema técnico de la vía laparotómica, el paso de aire hacia la cavidad torácica. Para esto, se pasaron dos puntos de seda, uno a cada lado de la pinza antes mencionada, incluyendo en ellos el peritoneo que recubre el músculo. Finalmente, se tomó una biopsia de la parte superior de la cúpula muscular así configurada. La toma se efectuó siempre con tijera, diseccionando las fibras musculares en su sentido longitudinal hasta visualizar la pleura diafragmática, y cortando por debajo de la propia pinza de Allis. Se obtuvo así una muestra fusiforme que se procesó en el mismo quirófano. Es interesante resaltar

que la correcta realización de la técnica hace innecesaria la sección del ligamento suspensorio del lóbulo hepático izquierdo para acceder al músculo. En todos los casos se concluyó con sutura de éste, mediante anudación de los puntos laterales y adición de puntos intermedios para asegurar una correcta hemostasia y cicatrización. Para prevenir retracciones y alteraciones residuales en la mecánica del Dfg se evitó el uso de electrocoagulación. El tamaño de la muestra osciló en todos los casos entre 0,5 y 1 cm \times 1 cm. Con posterioridad a la intervención se efectuaron controles radiológicos y analíticos para descartar la presencia de complicaciones, en especial de neumotórax o hemorragia.

Procesamiento de las muestras

Las muestras musculares fueron orientadas de forma que las fibras quedasen perpendiculares al plano de visión (corte transversal) y colocadas sobre un soporte de corcho. A continuación se recubrieron de gel convencional (OCT, Miles, Elkhart, IN, EE.UU.), siendo congeladas en isopentano (2-metilbutano) enfriado con nitrógeno líquido. Posteriormente, se obtuvieron cortes con un criotomo (Cry-cut 2800N, Reichert-Jung, Nusslock, Alemania) a -20°C , procediéndose a las tinciones con ATPasa a diferentes pH. Esta tinción permite identificar los diferentes tipos celulares del músculo. De forma resumida, una vez fijada la muestra en el portaobjetos, se incubó a temperatura ambiente en una solución formada por cloruro cálcico (2 cm³, 0,18 M), veronal sódico (2 cm³, 0,1 M) y agua destilada (6 cm³). El pH de la solución se ajustó hasta conseguir tres valores diferentes (4,2, 4,6 y 9,4) en otros tantos portaobjetos, correspondiendo a cortes sucesivos de la misma muestra. Los portaobjetos se incubaron de nuevo en una solución que contenía sal sódica de ATP (25 mg), cloruro cálcico (1 cm³, 0,18 M), veronal sódico (2 cm³, 0,1 M) y agua destilada (6 cm³), durante 45 min. A continuación se procedió a lavados consecutivos con cloruro cálcico (1%, 10 min), cloruro de cobalto (3 min), veronal sódico (0,01 M) con agua destilada y sulfuro amónico (30 s), y agua destilada. Finalmente, se deshidrató la muestra con alcohol a concentraciones progresivas (96, 99 y 100%) y se bañó en xilol. Esta técnica, utilizando el pH de 9,4, colorea las fibras de tipo I de gris tenue y las de tipo II de gris muy oscuro. Con el pH de 4,2 el efecto es justamente el contrario (fibras tipo I de gris oscuro y tipo II de gris claro). Finalmente, el pH de 4,6 permite diferenciar los dos subtipos de fibras II, ya que las IIa aparecen como claras mientras que las IIb (al igual que las I) aparecen más oscuras.

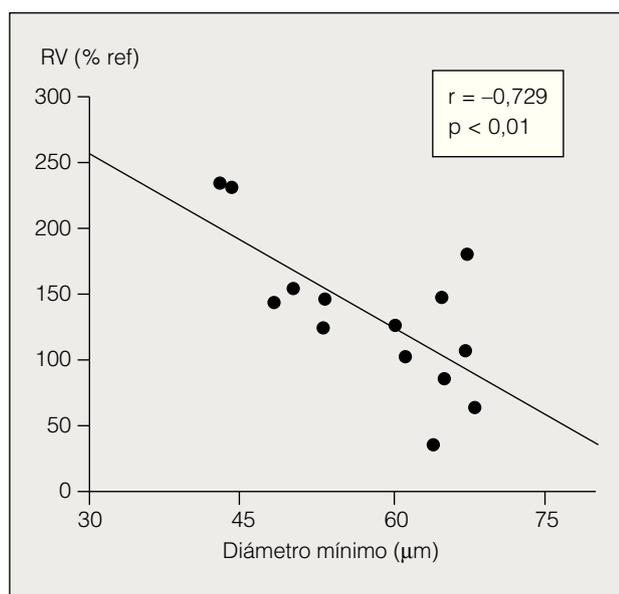


Fig. 3. Relación entre volúmenes pulmonares estáticos (RV) y tamaño fibrilar global del diafragma (D_m).

Análisis morfométrico

Se realizó con un sistema semiautomático Videoplan 2 (Zeiss, Kontron Electronics, Bremen, Alemania). Brevemente, consta de un microscopio óptico conectado a un lápiz digital, y ésta a su vez a un ordenador. Utilizando 40 aumentos, se reseguía con el lápiz óptico la periferia de la fibra, obteniéndose de forma automática el perímetro, área y diámetros medio y mínimo de ésta. En cada corte fueron evaluadas al menos 100 fibras, obteniéndose los valores morfométricos medios. A continuación se determinaron los índices de atrofia (IA) e hipertrofia (IH) de la muestra utilizando una escala que asigna "pesos" progresivos a las diferentes categorías de tamaño^{21,22}.

Análisis estadístico

Las variables aparecen como media y desviación estándar de ésta ($X \pm DE$). Las comparaciones de los porcentajes y tamaños fibrilares se realizaron mediante la prueba de Wilcoxon. No se efectuaron comparaciones entre las variables estructurales de los diferentes subgrupos de gravedad de la EPOC dado el tamaño de la muestra. Sin embargo, sí se efectuó el estudio de las relaciones entre variables continuas funcionales y estructurales, que fueron analizadas con la prueba de Pearson. En todos los casos se estableció un valor de significación del 0,05.

Resultados

Función pulmonar convencional y estudio nutricional

La técnica utilizada permitió la inclusión de pacientes con un amplio espectro de gravedad funcional (tabla I), que en todos los casos se hallaban eunutridos en el momento del estudio y en la subsiguiente cirugía (efectuada de uno a dos días después; BMI 23 ± 5 kg/m², pliegue triplicital 12 ± 2 mm, proteínas totales $6,6 \pm 0,6$ g/dl). Cabe resaltar la inclusión de 4 enfermos con EPOC grave ($FEV_1 \leq 50\%$ ref) y de sujetos con edades que raramente se asocian a patologías tributarias de toracotomía (p. ej., los casos 1, 2, 6, 7 y 10 que aparecen en la tabla I).

Fuerza muscular y músculos respiratorios y periféricos

Las presiones generadas por los MR a diferentes niveles se hallaban globalmente dentro de la normalidad, aunque con una gran dispersión de valores como corresponde al amplio espectro de gravedad funcional estudiado (tabla I). La fuerza en la mano no dominante fue globalmente normal (31 ± 8 dinas).

Técnica quirúrgica

En todos los pacientes fue posible la obtención de la muestra correspondiente de diafragma costal. En ningún caso se produjeron complicaciones peri o postoperatorias (hemorragia, dolor residual o neumotórax).

Estudio estructural

Las muestras de los 15 enfermos fueron válidas para el análisis morfométrico convencional. Los valores individuales y medios obtenidos en este análisis aparecen también en la tabla I. El tamaño de las fibras presentaba globalmente unos valores dentro de los límites de la normalidad, tanto para el D_m (variable menos afectada por el ángulo de corte; 57 ± 9 μ m; valores normales: 40-80 μ m), como para los IH (66 ± 78 ; valores normales inferiores a 250) e IA (195 ± 243 ; valores normales también inferiores a 250). No se observaron diferencias de tamaño entre los tipos I y II de fibra (D_m 58 ± 8 frente a 61 ± 8 μ m, respectivamente). Por otra parte, el D_m global era directamente proporcional al FEV_1/FVC ($r = 0,562$, $p = 0,03$) e inversamente proporcional a los volúmenes pulmonares estáticos (con RV% ref, $r = -0,729$, $p = 0,003$ [fig. 3]; con TLC% ref, $r = -0,629$, $p = 0,016$; con RV/TLC%, $r = -0,630$, $p = 0,016$), presentando una tendencia a la correlación directa con el FEV_1 ($r = 0,488$, $p = 0,06$). Estas relaciones eran fundamentalmente debidas a las fibras tipo II, siendo más débiles para las tipo I. Por otra parte, estas últimas fibras eran ligeramente predominantes en los Dfg de nuestra serie ($54 \pm 9\%$).

Discusión

Este trabajo describe una nueva técnica que permite obtener fácilmente muestras del Dfg humano de forma segura. Probablemente contribuya a facilitar los estudios estructurales del principal músculo respiratorio en dos poblaciones que hasta ahora resultaban difíciles de incluir: sujetos con afectación funcional grave e individuos jóvenes. Además, se trata de una técnica sencilla que puede ser realizada en prácticamente cualquier medio hospitalario.

En los últimos años ha ido creciendo el interés por conocer las características estructurales de los MR en la EPOC. Se sospechaba que las cargas que actúan sobre estos músculos podían condicionar cambios morfológicos, que a su vez influirían en su función^{23,24}. No se trataba únicamente de un debate teórico, sino que podía implicar cambios conceptuales en el abordaje de determinadas opciones terapéuticas, como la rehabilitación o

el uso de anabolizantes. Si los MR estaban en una situación estructuralmente desfavorable, había que entrenarlos y remodelar su estructura. Si, por el contrario, estaban ya remodelados, habría que plantearse el margen que quedaba para conseguir una mejoría funcional y estructural. Diferentes trabajos parecen confirmar que, efectivamente, los MR se hallan ya adaptados³⁻⁶, como consecuencia de las cargas resistivas y mecánicas que soportan^{6,25}. La expresión funcional de esta adaptación morfológica es que son capaces de generar incluso más presión que los MR de sujetos sanos, cuando ambas poblaciones respiran a volúmenes pulmonares elevados². Sin embargo, los estudios estructurales de los MR, y en concreto del Dfg, han sido muy limitados. Esto es debido fundamentalmente a los defectos inherentes a cada uno de los modelos de obtención de muestras. Por un lado, el músculo procedente de cadáver^{8,9} presenta los problemas obvios inherentes a la propia muerte y a los procesos celulares de todo tipo que la preceden y acompañan. Además, raramente se dispone de una evaluación funcional en fase estable y cercana al *exitus letalis*. Por último, con frecuencia el fallecimiento ha implicado un período final en que las cargas respiratorias podían haber estado más aumentadas. Otro modelo, la toracotomía por lesión pulmonar localizada^{4-6,10-13,23,24}, permite disponer de una correcta evaluación funcional en fase estable, pero presenta dos inconvenientes fundamentales: los pacientes con grave afectación funcional raramente son sometidos a la intervención, y los que sí son tributarios asocian casi siempre una neoplasia. Ésta puede afectar la estructura muscular a través tanto de problemas nutricionales como paraneoplásicos. Aunque ha sido el modelo más utilizado, extremando las precauciones respecto a la nutrición^{4-6,23,24}, persiste el problema de la limitación funcional. Éste no es un tema baladí, ya que es precisamente en los pacientes con EPOC grave en los que se espera encontrar los mayores cambios estructurales. De hecho, se han observado diversos procesos adaptativos que únicamente muestran tendencias⁴, hasta que se incluyen enfermos graves^{5,3}. Finalmente, y de forma muy reciente, se están obteniendo muestras procedentes de cirugía de reducción de volumen pulmonar³. Esto permite incluir pacientes graves y sin patología asociada. Por contra, raramente se incluyen franjas de edad relativamente precoces y, además, se trata de una intervención que sólo está disponible en medios muy concretos.

La técnica que proponemos, previamente utilizada por los autores en modelos animales¹⁴, se ha demostrado muy segura para su utilización amplia en humanos. Además, puede efectuarse en cualquier medio que permita la realización de laparotomía. Permite ampliar prácticamente sin límites el espectro funcional de los pacientes, incluyendo por un lado a aquellos con afectación muy grave, pero también a un número amplio de sujetos jóvenes y no fumadores. Esto último es también relevante, pues el modelo de toracotomía a menudo incluía como controles a individuos con espirometría normal, pero con potenciales afectaciones debidas al hábito tabáquico o a la propia neoplasia (p. ej., disminución de los flujos medios, atrapamiento aéreo, componente res-

trictivo o alteraciones endoteliales en los vasos musculares)^{4-6,23,24}. Permitir el estudio en franjas poblacionales de edad que raramente se someten a toracotomía o a cirugía de reducción de volumen pulmonar puede, además, facilitar la valoración del proceso de remodelamiento de los MR en diferentes fases de la vida. Extremo que tiene su interés, ya que es sabido que el entrenamiento de un músculo esquelético tiene umbrales y resultados que varían con la edad²⁶.

Como limitaciones del modelo que proponemos está el que con gran frecuencia la laparotomía se indica por un proceso neoplásico abdominal. Hoy en día, los nuevos tratamientos de otras patologías como la coledocistitis (laparoscopia) o el úlcus (fármacos) han reducido las indicaciones de esta vía quirúrgica de abordaje. Sin embargo, al igual que con la toracotomía, creemos que una cuidadosa selección de pacientes (enfermedad localizada, estado nutricional correcto, ausencia de síndromes paraneoplásicos o diselectrolitemia) permite obviar de forma razonable este problema.

Respecto a los resultados concretos del análisis estructural, cabe destacar que fue posible en todos los casos. Es decir, que la intervención propuesta permite obtener una muestra suficiente y adecuada. Además, aunque no era el propósito central de este trabajo, ha permitido observar varias relaciones morfofuncionales de interés, como la que asocia volúmenes pulmonares estáticos más elevados o menor índice espirométrico porcentual con fibras más pequeñas. Este hallazgo complementa estudios anteriores que habían observado que los pacientes con EPOC presentaban una tendencia a la "atrofia" de sus fibras⁷. Sea atrofia o proceso adaptativo, quizás para permitir una mejor relación entre el número de fibras y de capilares²⁷, lo cierto es que las fibras de estos enfermos parecen presentar tamaños inferiores a las de sujetos con función pulmonar normal. Este trabajo apunta a que se trata de un fenómeno no sólo cualitativo sino progresivo, a medida que la afectación funcional se vuelve más grave. Esta observación sólo ha sido posible gracias a la inclusión de enfermos en la franja alta de gravedad, por el uso de la técnica laparotómica.

En conclusión, la obtención de muestras del Dfg por laparotomía con la técnica que proponemos es un método seguro que requiere una mínima infraestructura y resulta útil para el estudio estructural de este músculo. Como ventajas respecto a modelos anteriores, permite un mayor espectro funcional y abre el potencial uso a otras poblaciones. Por otra parte, este estudio demuestra que el tamaño de las fibras musculares del Dfg es progresivamente menor cuando más grave es la enfermedad pulmonar.

Agradecimiento

A Ángela Roig y Nuria Soler por su inestimable ayuda en la realización de las pruebas funcionales respiratorias.

BIBLIOGRAFÍA

1. De Troyer A, Pride NB. The chest wall and respiratory muscles in chronic obstructive pulmonary disease. En: Roussos CH, editor. The thorax (2.ª ed.). Nueva York: Marcel Dekker Inc., 1995; 1975-2006.

2. Similowsky T, Yan S, Gauthier A, Macklem PT, Bellemare F. Contractile properties of the human diaphragm during chronic hyperinflation. *N Engl J Med* 1991; 325: 917-923.
3. Levine S, Kaiser L, Leferovich J, Tikunov B. Cellular adaptations in the diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 1997; 337: 1799-1806.
4. Orozco-Levi M, Gea J, Martín Campos M, Aguar MC, Félez M, Lloreta J et al. Sarcomere disruption and myosin isophorm expression in the diaphragm of COPD patients. *Eur Respir J* 1996 (Supl 23): 266-267.
5. Orozco-Levi M, Gea J, Martín-Campos JM, Aguar MC, Félez M, Broquetas J. Cambios en la estructura molecular de los músculos intercostales asociados a la EPOC. *Arch Bronconeumol* 1996; 32 (Supl 2): 9.
6. 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: 371-378.
7. Sánchez J, Derenne JP, Debesse B, Riquet M, Monod H. Typology of the respiratory muscles in normal men and in patients with moderate chronic respiratory diseases. *Bull Eur Physiopathol Resp* 1982; 18: 901-914.
8. Mizuno M, Secher NH. Histochemical characteristics of human expiratory and inspiratory intercostal muscles. *J Appl Physiol* 1989; 67: 592-598.
9. Thurlbeck WM. Diaphragm and body weight in emphysema. *Thorax* 1978; 33: 483-487.
10. 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 disease. *Respiration* 1983; 44: 321-328.
11. Hards JM, Reid WD, Pardy RL, Paré PD. Respiratory muscle fiber morphometry. *Chest* 1990; 97: 1037-1044.
12. Mizuno M, Secher NH, Saltin B. Fibre types, capillary supply and enzyme activities in human intercostal muscles. *Clin Physiol* 1985; 5: 121-135.
13. Orozco-Levi M. Cambios adaptativos en la estructura subcelular del diafragma humano [tesis doctoral]. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona, 1999.
14. Zhu E, Petroff B, Gea J, Comtois N, Grassino A. Membrane and sarcomere injury in diaphragm following inspiratory resistive breathing. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1110-1116.
15. Roca J, Sanchís J, Agustí-Vidal A, Segarra F, Navajas D, Rodríguez-Roisín R et al. Spirometric reference values for a mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Resp* 1986; 22: 217-224.
16. Roca J, Burgos F, Barberà JA, Sunyer J, Rodríguez-Roisín R, Castellsagué J et al. Prediction equations from plethysmographic lung volumes. *Respir Med* 1998; 92: 454-460.
17. Roca J, Rodríguez-Roisín R, Cobo E, Burgos F, Pérez J, Clausen JL. Single-breath carbon monoxide diffusing capacity (DLco) prediction equations for a mediterranean population. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 1026-1032.
18. Wilson SH, Cooke NT, Edwards RHT. Predicted normal values for maximal inspiratory pressure in caucasian adults and children. *Thorax* 1984; 39: 535-538.
19. Laporta D, Grassino A. Assessment of transdiaphragmatic pressure in humans. *J Appl Physiol* 1985; 58: 1.469-1.476.
20. Aran X, Gea J, Guiu R, Aguar MC, Sauleda J, Broquetas JM. Comparación de tres maniobras diferentes para la obtención de la presión transdiafragmática máxima. *Arch Bronconeumol* 1992; 28: 112-115.
21. Brooke MH, Engel WK. Histogramic analyses of human muscle biopsies with regard to fibre types I. *Neurology* 1969; 19: 221-233.
22. Dubowitz V. *Muscle biopsy: a practical approach*. Londres: Bailliere Tindall, 1985.
23. Sauleda J. Correlaciones entre la función y la estructura de los músculos respiratorios [tesis doctoral]. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona, 1994.
24. Sauleda 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: 906-911.
25. Pastó M. Expresión de las isoformas de cadenas pesadas de miosina y actividad enzimática en el diafragma de pacientes con EPOC [tesis doctoral]. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona, 1998.
26. Musaro A, Cusella de Angelis MG, Germani A, Ciccarelli C, Molinaro M, Zani BMA. Enhanced expression of myogenic regulatory genes in aging skeletal muscle. *Exp Cell Res* 1995; 221: 241-248.
27. Orozco-Levi M, Gea K, Lloreta J, Aguar MC, Félez M, Broquetas J. Daño sarcomérico y capilarización del diafragma en pacientes con EPOC. ¿Degeneración o remodelamiento muscular? *Arch Bronconeumol* 1996; 32 (Supl 2): 13.