

Biopsia de músculo liso bronquial mediante fibrobroncoscopia. Eficacia de la técnica en individuos con función pulmonar normal y en pacientes con EPOC

V. Curull^a, M. Orozco-Levi^{a,b}, D. Moyes^c, E. Balcells^a, J. Palacio^b, J. Lloreta^d y J.M. Broquetas^a

^aServei de Pneumologia. Unitat d'Endoscòpia Respiratòria. Hospital del Mar. Barcelona. España.

^bGrup de Recerca de Pneumologia. URRRA-IMIM. Universitat Autònoma de Barcelona (Prof. V.C. y J.M.B.), y CEXS-Universitat Pompeu Fabra (Prof. J.L.). Barcelona. España.

^cFellow Predoctoral. Grup de Recerca de Pneumologia. URRRA-IMIM. CEXS-Universitat Pompeu Fabra. Barcelona. España.

^dServei d'Anatomia Patològica. Hospital del Mar. Barcelona. España.

FUNDAMENTO Y OBJETIVOS: El epitelio y el músculo liso de las vías aéreas de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o asma bronquial evidencian cambios estructurales asociados probablemente con un aumento de la expresión de moléculas inflamatorias y con factores de crecimiento celular. El estudio de la relación entre enfermedad y cambios en el músculo liso bronquial es difícil si se restringe a muestras necróticas o de toracotomía. El presente estudio fue diseñado para evaluar la probabilidad de obtener músculo liso bronquial mediante biopsia bronquial endoscópica, tanto en pacientes con EPOC como en individuos con función pulmonar normal, su relación con la histología del epitelio bronquial, y la potencial utilidad para estudiar episodios de remodelado del músculo de la vías aéreas.

MÉTODOS: Se incluyó a 42 pacientes a quienes se realizó una fibrobroncoscopia con finalidad diagnóstica. Se tomaron sistemáticamente biopsias bronquiales de los espolones de división lobares y segmentarios. La estructura epitelial se analizó mediante histología convencional. El músculo liso fue identificado mediante inmunohistoquímica (anticuerpo antidesmina) y análisis por Western-blot (anticuerpos contra desmina, actina y miosina).

RESULTADOS: El 69% de las biopsias contenía músculo liso bronquial. La probabilidad de obtener músculo liso fue mayor en biopsias de bronquios segmentarios que lobares (el 72 frente al 30%; $p < 0,05$), y no evidenció relación con la presencia de EPOC ni con los signos de inflamación epitelial. Los fragmentos permitieron la identificación electroforética de proteínas estructurales implicadas en los procesos de remodelado muscular (miosina, actina, desmina).

CONCLUSIONES: La biopsia bronquial endoscópica permite obtener muestras de músculo liso bronquial, especialmente cuando se realiza en los bronquios segmentarios, en un elevado porcentaje de pacientes. Es posible que esta técnica sea útil en futuros estudios que evalúen los procesos de remodelado del músculo liso de la vía aérea.

Palabras clave: Fibrobroncoscopia. Músculo liso bronquial. Remodelado. EPOC. Desmina. Actina. Miosina.

Estudio subvencionado, en parte, por las becas ARMAR, FUCAP y SEPAR. Resultados preliminares presentados en el XXXIII Congreso Nacional SEPAR, 2000.

Correspondencia: Dr. V. Curull.
Servei de Pneumologia. Hospital del Mar.
P.º Marítim, 25-29. 08003 Barcelona. España.

Recibido: 2-4-2002; aceptado para su publicación: 18-6-2002.

Fiber-optic bronchoscopic biopsy of bronchial smooth muscle. Efficacy of the technique in individuals with normal lung function and patients with COPD

BACKGROUND AND OBJECTIVES: The epithelium and airway smooth muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) or bronchial asthma undergo certain structural changes that are probably related to increased expression of inflammatory molecules and cell growth factors. Studying the relation between disease and changes in bronchial smooth muscle is difficult if investigation is restricted to samples from autopsies or thoracotomies. This study was designed to evaluate the probability of obtaining bronchial smooth muscle by endoscopic bronchial biopsy in patients with COPD and from individuals with normal lung function, the relation of disease to bronchial epithelial histology, and the potential usefulness of studying airway muscle remodeling events.

METHODS: Forty-two patients undergoing diagnostic fiberoptic bronchoscopy were enrolled. Bronchial biopsies were taken systematically from the lobar and segmental dividing ridges. The epithelial structure was analyzed by conventional histology. The smooth muscle was identified by immunohistochemistry (anti-desmin antibody assay) and Western-blot analysis (anti-desmin, actin and myosin antibodies).

RESULTS: Sixty-nine percent of the biopsies contained bronchial smooth muscle. The probability of obtaining smooth muscle was higher in segmental than in lobar biopsies (72 vs 30%, $p < 0.05$). This probability was unrelated to the presence of COPD or to signs of epithelial inflammation. The fragments allowed us to use electrophoresis to identify protein structures (myosin, actin, desmin) involved in muscle remodeling processes.

CONCLUSIONS: Endoscopic biopsy of the bronchi allows us to obtain bronchial smooth muscle samples in a large percentage of patients, particularly when performed on segmental bronchi. The technique may be useful for future studies examining the processes of airway smooth muscle remodeling.

Key words: Fiberoptic bronchoscopy. Bronchial smooth muscle. Remodeling. COPD. Desmin. Actin. Myosin.

Introducción

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el asma bronquial se consideran enfermedades inflamatorias en las que se producen cambios tanto en el epitelio bronquial superficial como en la submucosa^{1,2}.

En estas enfermedades se observa un engrosamiento de la pared de las vías aéreas debido al incremento de componentes tisulares, como las glándulas mucosas, el tejido conectivo y el músculo liso bronquial^{3,4}.

Los cambios que ocurren en la estructura de las vías aéreas de pacientes con EPOC o asma se han denominado, en conjunto, procesos de remodelado bronquial^{5,6}. Desde un punto de vista estructural, estos cambios se asocian con el aumento tanto del número de miofibroblastos que expresan α -actina como del contenido de colágeno (tipos I, III y V)^{7,8}. Las implicaciones clínicas del remodelado de las vías aéreas parecen ser relevantes. Un modelo matemático reciente mostró que el simple engrosamiento de la capa muscular y del tejido conectivo de las vías aéreas, aún sin contracción activa del músculo, justifican en gran parte el cierre temprano y exagerado del lumen bronquial⁹. Sin embargo, no se ha definido si los procesos de remodelado del músculo liso y la expresión de mediadores proinflamatorios y de crecimiento celular guardan alguna relación con la clínica y la evolución de la enfermedad o la respuesta a tratamientos específicos, como broncodilatadores o antiinflamatorios¹⁰. Uno de los problemas implícitos en el análisis de estas relaciones es la evidencia de que los procesos de inflamación epitelial y remodelado se observan incluso en casos leves de EPOC y asma bronquial, y persisten a pesar del tratamiento con glucocorticoides¹¹⁻¹³.

Por todo lo anterior, en los últimos años se ha dado un especial énfasis al estudio de las relaciones entre presencia y gravedad de una enfermedad respiratoria con la estructura y función del músculo liso bronquial. Estos estudios implican la disposición de pruebas de función respiratoria y muestras de tejido bronquial que incluyan cantidades considerables de músculo liso¹². Desde un punto de vista metodológico, estas relaciones pueden incluir numerosos sesgos si la toma de muestras de tejido se realiza a partir de necropsias o toracotomía por enfermedades como las neoplasias broncopulmonares. Algunas alternativas como los modelos de experimentación animal o estudios *in vitro*¹⁴ tienen, a nuestro criterio, algunas limitaciones metodológicas importantes^{15,16}.

La fibrobroncoscopia es un procedimiento diagnóstico fundamental en la práctica clínica neumológica. Dado que con la técnica se accede a las vías aéreas inferiores, la fibrobroncoscopia permite tomar biopsias de tejido bronquial para estudiar las alteraciones epiteliales que acontecen en diferentes enfermedades. Además, es frecuente que los fragmentos de tejido obtenidos con el uso de esta técnica incluyan también tejido submucoso y muscular liso de las vías aéreas. A pesar de lo anterior, los autores no hemos podido encontrar estudios que evalúen sistemáticamente la eficacia de la biopsia bronquial mediante fibrobroncoscopia para obtener músculo liso bronquial. Frente al pequeño tamaño de la biopsia broncoscópica y el desconocimiento de la eficacia *a priori* para obtener músculo liso, se contraponen la mayor frecuencia, mayor accesibilidad y baja morbilidad de la técnica fibrobroncoscópica con relación a otros procedimientos como la toracotomía. El presente estudio fue diseñado para analizar el rendimiento de la biopsia bronquial endoscópica para la toma de muestras

de músculo liso de las vías aéreas inferiores en humanos, tanto en individuos con función pulmonar normal como pacientes con EPOC. Los pacientes fueron seleccionados de forma prospectiva a partir del gabinete de endoscopia respiratoria de nuestro centro. El método biopsico fibrobroncoscópico incluyó equipos y técnicas convencionales. Las muestras de tejido fueron procesadas y analizadas mediante técnicas histológicas convencionales, inmunohistoquímica y electroforesis de proteínas.

Material y métodos

Población

Se seleccionó a un total de 42 pacientes de sexo masculino de 63 ± 8 años de edad (límites, 47-75) a quienes se practicó fibrobroncoscopia con finalidad diagnóstica. La procedencia de los pacientes fue del Servicio de Neumología del Hospital del Mar de Barcelona. Los pacientes fueron asignados a dos grupos de estudio según los datos espirométricos. El grupo control estuvo representado por pacientes con volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV₁) > 70% pred, mientras que el segundo (grupo EPOC) estuvo constituido por los pacientes con FEV₁ < 70% pred. El diagnóstico de EPOC lo hizo un médico especialista a partir de una conjunción de antecedentes de exposición prolongada al humo de tabaco, clínica compatible con bronquitis crónica o enfisema, y espirometría demostrativa de obstrucción fija al flujo aéreo¹⁷. Se incluyeron representantes de todo el espectro de gravedad de la EPOC, definido por el FEV₁^{17,18}. Como criterios de exclusión se consideraron la sospecha clínica de asma bronquial, presencia de prueba broncodilatadora significativa (cambio en el FEV₁ \geq 200 ml [\geq 12%] tras la inhalación de 200 μ g de salbutamol), antecedentes de agudización en los últimos 2 meses, o haber recibido tratamiento con corticoides orales o inhalados durante el último mes. Se excluyó, además, a aquellos pacientes en quienes se observó durante la endoscopia tumoraciones en la tráquea, los bronquios principales o lobares, los signos de inflamación aguda o la evidencia de infección bronquial. Las características generales de la población estudiada se resumen en las tablas I y II.

Diseño y ética

La investigación fue diseñada como un estudio transversal, descriptivo, de tipo de casos y controles, y acorde a las normas para la investigación en humanos (Declaración de Helsinki, Finlandia, 1984). El protocolo y sus respectivas intervenciones fueron aprobados por el comité de ética e investigación clínica de nuestra institución. Todos los pacientes aceptaron participar en el estudio y firmaron la hoja de consentimiento informado una vez explicados los objetivos del estudio y sus potenciales riesgos.

Mediciones e intervenciones

En todos los casos, previamente a la realización de la fibrobroncoscopia, se llevaron a cabo pruebas funcionales respiratorias que incluyeron espirometría forzada, prueba broncodilatadora ante la inhalación de salbutamol, volúmenes pulmonares estáticos (Masterlab, Jaeger, Würzburg, Alemania) y resistencia de la vía aérea determinados por pletismografía, capacidad de transferencia del monóxido de carbono por el método de la respiración única y gasometría arterial en reposo respirando aire ambiente (AVL-945, Biomedic, Basilea, Suiza).

TABLA I
Características individuales de los pacientes seleccionados en el estudio

N.º	Edad (años)	Tabaquismo		Metaplasia escamosa ^a	Diagnóstico final del caso ^b
		Exposición	Paquetes-año		
1	61	Ex fumador	120	No	Adenocarcinoma
2	55	Ex fumador	40	No	Carcinoma de células grandes
3	63	Actual	35	No	Hemoptisis (d.c.)
4	50	Actual	100	No	No neoplasia
5	74	Actual	55	No	Carcinoma microcítico
6	63	Actual	90	No	Hemoptisis (d.c.)
7	67	Actual	45	No	No neoplasia (TBC)
8	67	Actual	60	No	Carcinoma escamoso
9	74	Ex fumador	70	No	Carcinoma escamoso
10	61	Actual	40	No	Hemoptisis (d.c.)
11	68	Ex fumador	40	No	Carcinoma escamoso
12	56	Ex fumador	50	No	Adenocarcinoma
13	70	Actual	50	Sí	Adenocarcinoma
14	68	Ex fumador	60	No	Carcinoma escamoso
15	55	Actual	35	No	Carcinoma escamoso
16	74	Ex fumador	70	No	Carcinoma escamoso
17	65	Ex fumador	50	Sí	Adenocarcinoma
18	71	Actual	60	No	Carcinoma escamoso
19	64	Ex fumador	90	No	Adenocarcinoma
20	64	Ex fumador	50	No	Carcinoma escamoso
21	75	Ex fumador	25	No	Carcinoma microcítico
22	68	Actual	130	No	Carcinoma escamoso
23	47	Actual	67	No	Carcinoma microcítico
24	68	Ex fumador	78	No	
25	55	Actual	70	Sí	Carcinoma escamoso
26	48	Actual	25	No	Adenocarcinoma
27	73	Ex fumador	35	No	Adenocarcinoma
28	61	Actual	65	Sí	Carcinoma escamoso
29	63	Actual	70	No	Adenocarcinoma
30	72	Actual	56	No	Carcinoma escamoso
31	66	Actual	2	Sí	Carcinoma escamoso
32	49	Actual	40	No	Adenocarcinoma
33	58	Actual	50	No	Linfoma
34	62	Actual	50	No	Adenocarcinoma
35	64	Actual	50	No	Adenocarcinoma
36	68	Ex fumador	10	Sí	Carcinoma escamoso
37	59	Ex fumador	70	Sí	Carcinoma escamoso
38	52	Actual	32	No	Carcinoma escamoso
39	57	Ex fumador	40	No	Hemoptisis (d.c.)
40	70	Ex fumador	40	No	Hemoptisis (d.c.)
41	51	Actual	50	No	Carcinoma escamoso
42	65	Actual	60	Sí	Adenocarcinoma

Resumen de algunas de las variables demográficas y de exposición al humo del cigarrillo de los pacientes que fueron incluidos en el estudio.

^aSe denota si la biopsia remitida a anatomía patológica evidenciaba alteración epitelial de tipo metaplasia escamosa. ^bEl resumen de cada caso aparece expresado como diagnóstico final en el que se anota el diagnóstico clínico y/o hallazgos en la biopsia de la lesión motivo de estudio clínico procesada por anatomía patológica. TBC: tuberculosis pulmonar; d.c.: diversas causas (p. ej., bronquiectasias infectadas, bronquitis aguda, etc.).

TABLA II
Características generales de los pacientes incluidos en el estudio

	Controles	EPOC	p
N	19	23	-
Edad	62 ± 7	64 ± 8	NS
IMC, kg/m ²	24 ± 2	23 ± 3	NS
FEV ₁ , % pred	83 ± 12	57 ± 8	< 0,01
Albúmina, g%	3,6 ± 0,8	3,1 ± 0,5	NS

IMC: índice de masa corporal; NS: no significativo desde el punto de vista estadístico.

Fibrobroncoscopia. La fibrobroncoscopia fue realizada de forma convencional. Brevemente, todos los pacientes recibieron premedicación con atropina (1 mg por vía intramuscular). Las vías aéreas superiores se anestesiaron con lidocaína (v/v, 2%) antes de iniciar la exploración. La fibrobroncoscopia se realizó mediante un equipo de videobroncoscopio flexible (Olympus BF-200 o BF-P200, Olympus Co, Tokio, Japón) introducido por vía nasal o bucal, según el caso. Con el extremo distal del broncoscopio en la tráquea y al inicio de ambos bronquios principales se instilaban hasta un máximo de 10 ml

de lidocaína al 2%. Se realizó un examen sistemático de ambos árboles bronquiales. Durante la exploración se controlaba la saturación de oxígeno mediante pulsioxímetro digital. Se administró oxígeno suplementario mediante cánula nasal cuando la saturación se hallaba por debajo del 90%.

Técnica de biopsia bronquial. Tras la visualización del árbol traqueobronquial y tras las técnicas broncoscópicas pertinentes para el estudio de la enfermedad respiratoria del paciente, se tomaron tres biopsias en los espolones de división tanto lobares como segmentarios. Se escogieron aquellos lugares anatómicos macroscópicamente normales. En los casos de evidencia endoscópica de lesión focal se tomaron biopsias de sitios anatómicos distantes pero homolaterales a la misma. En todos los casos se utilizaron técnica y pinza biopsica convencionales (Olympus FB-21C).

Conservación y fijación de las biopsias. En todos los casos se sistematizó la asignación de las tres biopsias para diferentes procesamientos y análisis. Específicamente, la primera de las biopsias se remitió al departamento de anatomía patológica para valoración histológica convencional, para lo cual se fijó mediante inmersión en solución de formaldehído (v/v,

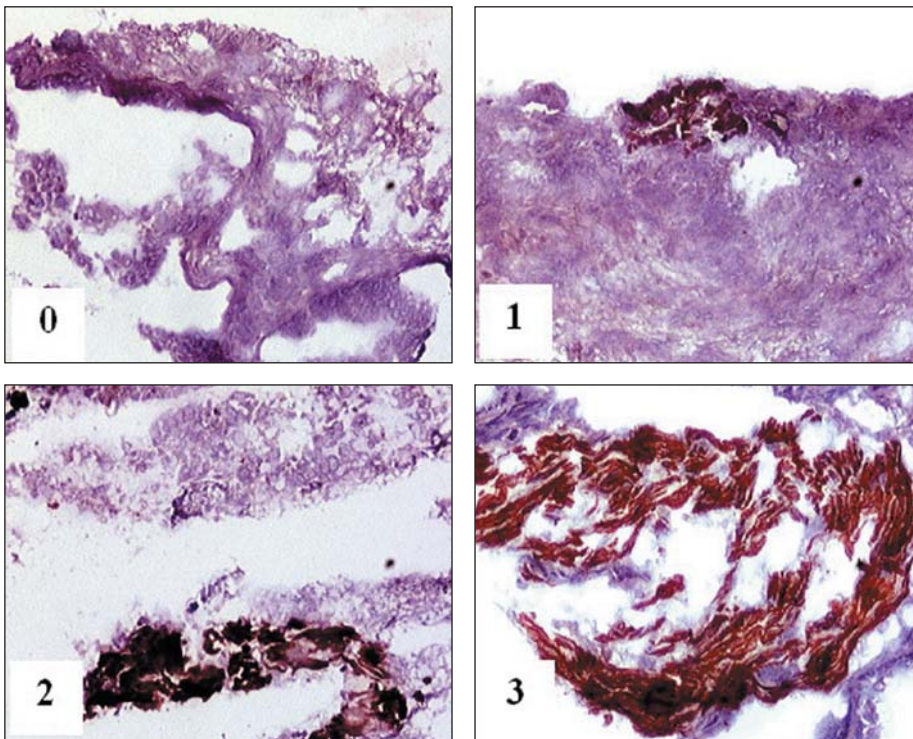


Fig. 1. Figuras representativas de las diferentes categorías de biopsias según el resultado obtenido tras el procesamiento con métodos de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos monoclonales contra la molécula de desmina. El tejido muscular liso aparece identificado específicamente mediante color marrón (técnica de estreptavidina-peroxidasa), mientras que el resto de tejido bronquial se observa en tonalidades azules. (Para más detalles, véase texto.)

10% [pH, 7,20]) y se contrastó con hematoxilina-eosina. La segunda biopsia se destinó a los estudios de inmunohistoquímica. Ésta se fijó en solución de formaldehído (v/v, 10% [pH, 7,20]) e incluyó en parafina. Se realizaron cortes consecutivos mediante un equipo de microtomía (Leica RM 2035) y las secciones obtenidas se fijaron sobre laminillas de vidrio recubiertas con APES (Sigma-Aldrich, Madrid). Posteriormente las muestras fueron deshidratadas, deparafinadas y destinadas a los estudios morfométricos tras realizarse las técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos específicos, como se indica en un apartado posterior. La tercera biopsia se congeló por inmersión en nitrógeno líquido y se preservó a -70°C hasta su procesamiento para electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Estas muestras fueron transferidas a papel de nitrocelulosa y destinadas a la técnica de Western-blot, como se especifica más adelante.

Detección de proteínas musculares mediante inmunohistoquímica. Se eligió la detección inmunohistoquímica de desmina en las muestras parafinadas como técnica indicadora de la presencia de músculo liso en los cortes biopsicos. Las biopsias fueron estudiadas en toda su extensión mediante la realización de cortes microtómicos de $6\ \mu\text{m}$ a intervalos regulares de $25\ \mu\text{m}$ (total, 8-10 cortes por cada muestra). Las laminillas fueron procesadas para inmunohistoquímica según técnicas convencionales utilizando anticuerpos monoclonales antidesmina (Biodesign, Clone-D33, Barcelona). En todos los casos se incluyó como control negativo un corte secuencial que, montado en la misma laminilla, fue procesado de forma simultánea con idéntico protocolo, con la diferencia que no se expuso al anticuerpo primario antidesmina. La reacción antígeno-anticuerpo fue revelada mediante un método amplificador cromático de estreptavidina-peroxidasa (The Binding Site, IC019, Reino Unido). Se utilizó la tinción de hematoxilina (Bio-óptica, M06002) para obtener contraste. Todas las imágenes microscópicas se digitalizaron con un programa de micromorfometría celular (Pixera Studio Versión 1.2, 1996-98

Pixera Corporation, EE.UU.) acoplado a un microscopio óptico (Olympus Serie BX50F3, Olympus Optical Co. Japón). Las variables evaluadas desde el punto de vista cuantitativo fueron: proporción de músculo liso (%), grosor epitelial (μm), número de células epiteliales ($\text{n}/\mu\text{m}$), grosor de membrana basal (μm) e índice de bronquitis, según Thompson et al¹⁹. La proporción de zona teñida (tejido marcado) fue expresada como proporción respecto al total de la muestra tisular mediante la categorización en escala de intervalos (fig. 1). La categoría 0 correspondió a las biopsias sin músculo liso; la categoría 1 a aquellas con $< 25\%$ del tejido teñido; la 2, a aquellas con tinción entre el 25 y el 50% del fragmento, y la 3, cuando más del 50% del fragmento se observó teñido. El valor medio de la proporción obtenido en las laminillas de cada biopsia se consideró la variable representativa de la cantidad de músculo liso y fue el valor incluido en el análisis. La valoración histológica convencional fue utilizada para evaluar la integridad del epitelio y la eventual presencia de alteraciones de diferenciación celular en el mismo.

Detección de proteínas musculares mediante Western-blot. El subgrupo de muestras congeladas fue destinado a técnicas de extracción y separación de proteínas con tal de identificar las moléculas de desmina, miosina y actina del músculo liso bronquial. La extracción de proteínas se realizó por el método de Laemmli²⁰. La separación de proteínas se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (10%) en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Se utilizaron patrones de peso molecular de rango amplio (Bio-Rad Laboratories, Barcelona). Los geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para ser procesados según técnica de Western-blot. Para esta técnica se seleccionaron tres anticuerpos monoclonales específicos contra desmina, actina y miosina (Enzo Diagnostics, NY-Biodesign, Barcelona). Las imágenes obtenidas se digitalizaron y analizaron mediante un programa de densitometría digital (Molecular Analyst Software, Bio-Rad Laboratories).

Análisis estadístico

Los valores de las diferentes variables aparecen expresados como la media \pm desviación estándar (DE) tanto en el texto como en las tablas y figuras. La evaluación de la eficacia técnica biopsica se realizó sobre los fragmentos incluidos en parafina tanto en términos de proporción (%) como de probabilidad. La diferencia de la probabilidad en el grupo EPOC frente al grupo control se evaluó mediante el cálculo de la razón de exceso (*odds ratio* [OR]). La diferencia en las proporciones de biopsias con músculo liso se evaluó mediante la prueba exacta de Fisher. Se consideró significativo un valor de error alfa $p < 0,05$.

Resultados

Características generales de la población

Un total de 42 pacientes fue considerado elegible según los criterios de inclusión del estudio. Este número fue equivalente al 3% del total de procedimientos de fibrobroncoscopia realizados en el período de 30 meses consecutivos (septiembre de 1998 hasta marzo de 2001). En ningún caso se presentaron complicaciones mayores durante la toma de biopsias bronquiales. Todos los pacientes presentaron hemorragia de escasa cantidad (no cuantificable) en el sitio de la toma de biopsias. Ninguno requirió intervención específica para hemostasia. Treinta y dos (76%) de los pacientes cumplían criterios clínicos de bronquitis crónica, y veintitrés (55%) cumplían criterios funcionales de obstrucción crónica del flujo aéreo. Específicamente, el grupo EPOC estuvo representado por pacientes en todo el espectro de gravedad (rango FEV₁, 36-70% pred). Todos los casos tenían antecedentes de tabaquismo (índice acumulado, 54 \pm 23 paquetes-año), siendo activo en el momento del estudio en 26 de ellos. Algunas de las características generales de la población estudiada aparecen resumidas en las tablas I y II.

Histología del epitelio bronquial

Las muestras procedentes de 8 casos (19%) demostraron signos de metaplasia escamosa (tabla I). No se evidenció en ninguna muestra la presencia de células malignas.

Inmunohistoquímica del músculo liso bronquial

La identificación de las moléculas de desmina fue positiva en el 69% de los fragmentos analizados (n = 28; intervalo de confianza [IC] del 95%: 52,9-82,4%). Las fibras musculares se observaron siempre en sentido multidireccional y con evidentes signos de artefactos por compresión. La proporción de biopsias con músculo liso fue mayor en las muestras procedentes de los espulones de división segmentarios que en las procedentes de los bronquios lobares (el 72 frente al 30%, respectivamente; $p < 0,05$) con una razón de prevalencia de 2,4. Al realizarse el análisis estratificado según el FEV₁, se detectó músculo liso bronquial en el 81,3% (OR, 4,3) de las biopsias en el grupo control y el 61,5% (OR, 1,6)

TABLA III
Diferencias en el contenido proporcional de músculo liso según el grupo de estudio

Categorías	0	1	2	3	Total de muestras
Porcentaje de músculo liso	0%	1-25%	25-50%	> 50%	
Grupo EPOC, n (%)	10 (43)	5 (22)	6 (26)	2 (9)	23 (55)
Grupo control, n (%)	4 (22)	5 (26)	5 (26)	5 (26)	19 (45)
Total, n (%)	14 (33)	10 (24)	11 (26)	7 (17)	42 (100)

Número (y porcentaje) de biopsias obtenidas y su categorización acorde con la proporción de músculo liso observado tras el procesamiento inmunohistoquímico con anticuerpos monoclonales antidesmina. Además, se describen las frecuencias y proporciones de acuerdo con el grupo de estudio, control o EPOC, según el caso.

TABLA IV
Relación entre las características del epitelio bronquial y la presencia de músculo liso bronquial en las biopsias

	Categorías			
	0	1	2	3
Músculo liso	Ausente	Presente	Presente	Presente
Grosor epitelial, mm	42 \pm 27	38 \pm 9	58 \pm 35	108 \pm 125
Grosor de membrana basal, mm	9 \pm 1	7 \pm 2	9 \pm 4	9 \pm 4
Índice epitelial, %	54 \pm 8	40 \pm 10	51 \pm 15	53 \pm 16
Índice de bronquitis, u.a.	8,7 \pm 4,2	6,5 \pm 4,1	6,7 \pm 4,4	7,6 \pm 4,1

Características morfométricas y cuantificación del grado de preservación (índice epitelial) e inflamación (índice de bronquitis) del epitelio bronquial en los fragmentos biopsicos analizados. Las categorías están definidas por la proporción de músculo liso cuantificado en cada una de ellas (véase texto). u.a.: unidades arbitrarias, según Thompson et al. (Para especificaciones técnicas, véase texto.)

en el grupo EPOC. Sin embargo, no se encontró asociación entre la presencia de la enfermedad y la eficacia de la técnica biopsica (tabla III). Esto se deduce a partir de que la diferencia entre las proporciones de biopsias con músculo liso en los dos grupos fue de 19,8% pero sin alcanzar significación estadística. No se objetivaron correlaciones entre las características del epitelio (índice de inflamación, grosor, descamación) ni de la membrana basal (grosor) con la eficacia de la técnica endoscópica para obtener muestras de músculo liso. Sin embargo, el grosor del epitelio evidenció una tendencia a correlacionarse directamente ($p = 0,09$) con la eficacia de la biopsia para la obtención de músculo liso bronquial (tabla IV).

Western-blot de proteínas musculares

La técnica de electroforesis permitió obtener el patrón de bandas electroforéticas con pesos representativos de proteínas del músculo liso bronquial, tanto desmina como actina y miosina (fig. 2). Las bandas de alto y bajo peso molecular se detectaron con tinciones de plata y azul de Coomassie. El patrón de bandas obtenido fue similar en ambos lugares anatómicos de la biopsia. El Western-blot permitió identificar las bandas corres-

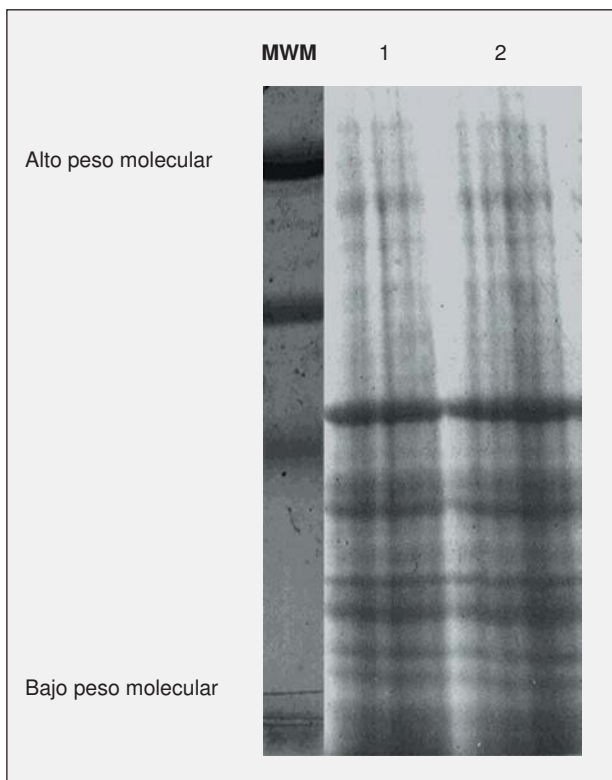


Fig. 2. Identificación de proteínas de peso molecular diverso obtenidas tras los procesos de homogeneización, desnaturalización y electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE, tinción de azul de Coomassie). MWM: marcadores de referencia del peso molecular; 1 y 2: productos de extracción de dos fragmentos procedentes de un individuo con función pulmonar normal (paciente 42) y un paciente con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) grave (paciente 13), respectivamente.

pondientes de desmina, actina y miosina de músculo liso en el 42% de los fragmentos, todos los cuales quedaban incluidos en las categorías 2 y 3 de la clasificación por inmunohistoquímica. La mayoría de éstos (74%) correspondía a fragmentos de bronquios segmentarios.

Discusión

El presente estudio demuestra que la biopsia bronquial mediante fibrobroncoscopia permite obtener muestras de músculo liso de las vías aéreas en cerca de un 70% de sujetos, tanto en individuos con función pulmonar normal como en pacientes con EPOC. En nuestro estudio, las biopsias permitieron obtener material suficiente para extraer fracciones proteicas propias del músculo liso, incluso las fracciones con más alto peso molecular (p. ej., cadenas pesadas de miosina).

A pesar de realizar una búsqueda específica en diferentes bases de datos de artículos biomédicos, los autores no hemos podido encontrar ningún estudio que haya evaluado de forma sistemática la eficacia de la biopsia bronquial mediante fibrobroncoscopia para obtener músculo liso en individuos sanos o enfermos. Esto impide que nuestros resultados sean contrastados pero, al mismo

tiempo, resalta la novedad de la información derivada del estudio.

La técnica biopsica utilizada en el presente estudio es habitual en los gabinetes de endoscopia respiratoria cuando se desea hacer una evaluación histológica de enfermedades que pueden afectar las vías aéreas, bien sean infecciosas o no. Otras técnicas como la biopsia a cielo abierto en pacientes llevados a toracotomía (p. ej., intervención por neoplasias o enfisema) podrían ser consideradas alternativas útiles para obtener muestras de músculo bronquial. Sin embargo, se limitan al estudio de pacientes únicamente con afecciones respiratorias, que cumplan con los criterios para dichas intervenciones, y no permiten la realización de estudios longitudinales e intervencionistas. En este sentido, la biopsia bronquial endoscópica puede ofrecer un espectro más amplio incluyendo a individuos con función pulmonar normal, asma bronquial o EPOC cuyo estadio contraindicase la toracotomía por alguna causa, e incluso considerar la posibilidad de biopsias seriadas en estudios prospectivos.

La inflamación epitelial es un hallazgo habitual tanto en el asma bronquial como en la EPOC. Los mediadores proinflamatorios y las moléculas implicadas en su modulación parecen ser los responsables de la mayoría de cambios estructurales y funcionales del músculo liso bronquial²¹. Recientemente se ha dado énfasis al papel que los mismos miocitos pueden tener en la producción local de mediadores proinflamatorios. Desde un punto de vista teórico, podría ser lógico postular que el grado de inflamación del epitelio afectara el rendimiento de la biopsia de músculo liso bronquial. Por una parte, el incremento del grosor podría alejar de la superficie epitelial al tejido muscular y a la membrana basal, de forma que se dificultara el acceso mediante la pinza biopsica al tejido de interés, en este caso, el músculo. Sin embargo, podría también asumirse, por el contrario, que el remodelado y potencial engrosamiento de la capa muscular asociados a la inflamación epitelial crónica podrían facilitar la toma de los fragmentos con contenido muscular. Resulta de interés que nuestro estudio permite aclarar en parte este concepto. Una gran proporción de las biopsias obtenidas a partir de los pacientes con EPOC presentaba inflamación epitelial, e incluso algunas, metaplasia escamosa. Sin embargo, las características histológicas del epitelio no modificaron el rendimiento de la técnica entre los grupos control y EPOC. De hecho, las características morfométricas, la cuantificación del grado de preservación del epitelio (índice epitelial), y el grado de inflamación (índice de bronquitis) del mismo no demostraron asociación con la presencia o ausencia de músculo en las biopsias. Sin embargo, la eficacia de la técnica sí resultó afectada por el lugar anatómico de la toma de biopsia. Esto se deduce porque la mayor proporción de fragmentos con músculo liso se observó en aquellos procedentes de los espaldones de división intersegmentarios. La menor distancia entre el músculo liso de la submucosa y la superficie epitelial en el bronquio segmentario podrían explicar el mayor rendimiento de la biopsia endoscópica en la obtención de músculo liso en esta zona en comparación con el bronquio lobar don-

de, aunque hay una mayor cantidad de músculo liso, éste se halla a una mayor profundidad de la superficie epitelial²².

Uno de los puntos que merece especial énfasis es precisamente que, a criterio de los autores, la técnica propuesta en el presente estudio para obtener músculo liso bronquial eventualmente permitirá evaluar y caracterizar los procesos de "remodelado" de las vías aéreas en enfermedades como la EPOC y el asma, entre otras. Brevemente, esta hipótesis se basa en los siguientes argumentos. La desmina es una de las moléculas no contráctiles constitutivas del citoesqueleto muscular (filamentos intermedios)²³. Está presente en todas las células musculares, incluyendo las de las vías aéreas. Las moléculas de actina y miosina son elementos constitutivos de la pared bronquial cuya contracción mediada por calcio modifica el diámetro de la vía aérea. Los autores suponemos que la técnica de electroforesis permitirá cuantificar los cambios en ambos grupos de moléculas contráctiles si se expresan en forma de proporción respecto al contenido de desmina. En este caso, el contenido proporcional de cada molécula de interés se deducirá a partir de una expresión donde la absorvancia de desmina será la unidad (100%):

$$100 \times \left(\frac{\text{[absorvancia de actina/absorvancia desmina]}}{\text{[absorvancia miosina/absorvancia desmina]}} \right)$$

Esta cuantificación se ha mostrado útil en un estudio preliminar complementario en curso mediante el análisis densitométrico por transiluminación de geles o de soportes sólidos del Western-blot. Asimismo, creemos que la técnica podría ser aplicable para el análisis de otras moléculas de interés (p. ej., TGF, leucinas, etc.). Este tipo de análisis ha sido utilizado por nuestro grupo en algunos estudios previos de músculo esquelético²⁴.

Las limitaciones del presente estudio tienen que ver con el tamaño y tipo de la población seleccionada, el número de muestras biópsicas realizadas en cada sujeto, y las técnicas de análisis de la presencia de músculo liso. El estudio sólo incluyó a individuos que a criterio de un médico especialista, tenían indicaciones para la realización de una fibrobroncoscopia. Este diseño obedeció fundamentalmente a aspectos éticos por los que se justificó como innecesario el incluir sujetos sanos. Otro punto a resaltar es la ausencia de pacientes de sexo femenino que no fueron incluidas para obviar el potencial sesgo dependiente del género. Futuros estudios podrían evaluar si la eficacia de la biopsia bronquial por fibrobroncoscopia para obtener muestras de músculo liso se modifica en este tipo de población aunque, desde un punto de vista técnico, nos parece improbable. El número de biopsias destinadas al presente estudio estuvo limitado a tres de cada uno de los sujetos. Es probable que un mayor número de biopsias pudiera aumentar la eficacia de la técnica con un mínimo incremento de la morbilidad pero, por razones prácticas, esto fue obviado en nuestro diseño. Las técnicas de inmunohistoquímica y Western-blot con tinciones de plata o azul de Coomassie que incluimos en el estudio tienen una sensibilidad adecuada, pues incorporan sistemas de am-

plificación de la señal colorimétrica. Sin embargo, es posible que técnicas que utilicen otros sistemas de amplificación de señales como la quimioluminiscencia, señal por radionúclidos o amplificación enzimática de ácidos nucleicos puedan tener una mayor sensibilidad en estudios moleculares específicos²⁵.

Potencial relevancia clínica

Procedimientos diagnósticos como la broncoscopia pueden tener una aplicación en estudios transversales o incluso intervencionistas (p. ej., respuesta a fármacos) cuando se desee analizar el papel potencial del músculo liso en enfermedades como la EPOC o el asma²⁶. Existen evidencias de que el músculo liso bronquial se modifica por la presencia de moléculas inflamatorias y factores de crecimiento celulares²⁷. Sin embargo, ser la diana de estas moléculas no parece ser el único rol desempeñado por el músculo liso, y recientemente se ha dado énfasis al papel que las propias células musculares tienen en la síntesis de estas moléculas y su potencial asociación con características clínicas en algunas enfermedades. Entre éstas destacan las que cursan con obstrucción al flujo aéreo, pero se desconoce la relación que puede existir entre los fenómenos de remodelado *in vivo* y algunas características como la susceptibilidad a la obstrucción, la respuesta al tratamiento broncodilatador o incluso la potencial respuesta al tratamiento antiinflamatorio²⁸. Los modelos a partir de necropsia parecen inadecuados por los innumerables sesgos asociados a los cambios *post mortem*, la dificultad de un estudio funcional cercano en el tiempo o la imposibilidad de obviar los efectos de otras enfermedades en el período previo a la defunción. Por todo lo anterior, consideramos relevantes los presentes resultados, que ofrecen datos suficientes para el cálculo de tamaño muestral en el diseño de futuros estudios de investigación del músculo liso bronquial en humanos, tanto descriptivos como intervencionistas²⁹.

En conclusión, el presente estudio demuestra que la biopsia bronquial mediante fibrobroncoscopia realizada por personal especializado permite obtener muestras de músculo liso bronquial en humanos en alrededor de un 70% de sujetos con función pulmonar normal o pacientes con EPOC. Nuestra percepción es que los fragmentos biópsicos obtenidos permiten realizar análisis histológicos y bioquímicos que eventualmente pueden ser de utilidad en estudios de evaluación del remodelado del músculo liso de las vías aéreas inferiores, en presencia de enfermedades respiratorias crónicas como el asma y la EPOC, así como su posible respuesta ante tratamientos específicos (p. ej., broncodilatadores y corticoides).

Agradecimiento

Los autores agradecen el liderazgo colaborativo del Prof. J. Gea, así como la participación de las enfermeras Ángela Roig y Nuria Soler en las pruebas de función pulmonar y procedimientos endoscópicos; a la Dra. Carme Casadevall y Enf. Nurria Hernández, en la recolección de algunas de las muestras biópsicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Buist AS, Calverley PMA. COPD: current concepts and future prospects. *Eur Respir Rev* 1996;6:249-94.
2. Burrows B. Epidemiologic evidence for different types of chronic airflow obstruction. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:1452-5.
3. Mullen JB, Wright JL, Wiggs BR, Pare PD, Hogg JC. Reassessment of inflammation of airways in chronic bronchitis. *BMJ* 1985; 291:1235-9.
4. Dunnill MS, Massarella GM, Anderson JA. A comparison of the quantitative anatomy of the bronchi in normal subjects, in status asthmaticus, in chronic bronchitis, and in emphysema. *Thorax* 1969; 24:176-9.
5. Mullen JB, Wright JL, Wiggs BR, Pare PD, Hogg JC. Reassessment of inflammation of airways in chronic bronchitis. *BMJ* 1985; 291:1235-9.
6. Redington AK, Howart PG. Airway remodelling in asthma. *Thorax* 1997;52:310-2.
7. Brewster CEP, Howarth PH, Djukanovic R, Wilson J, Holgate ST, Roche WR. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990;3:507-11.
8. Halayko AJ, Salari H, Xuefei MA, Stephens NL. Markers of airway smooth muscle cell phenotype. *Am J Physiol* 1996;270: 1040-51.
9. Wiggs BR, Bosken C, Paré PD, Hogg JC. A model of airway narrowing in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:1251-8.
10. Chung KF. Airway smooth muscle cells: contributing to and regulating airway mucosal inflammation? *Eur Respir J* 2000;15:961-8.
11. Bosken CH, Wiggs BR, Paré PD, Hogg JC. Small airway dimensions in smokers with obstruction to airflow. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:563-70.
12. Ebina M, Takahashi T, Chiba T, Motomiya M. Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:720-6.
13. Jefferey PK, Godfrey RW, Adelroth E, Nelson F, Rogers A, Johansson SA. Effects of treatment on airway inflammation and thickening of basement membrane reticular collagen in asthma. *Ann Rheum Dis* 1992;145:890-9.
14. Hall IP, Kotlikoff M. Use of cultured airway myocytes for study of airway smooth muscle cell phenotype. *Am J Physiol* 1996;250: 1040-51.
15. Hautamaki RD, Kobayashi RM, Shapiro SD. Macrophage elastase is required for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* 1997;277:2002-4.
16. Martin JG, Duguet A, Eidelman DH. The contribution of airway smooth muscle to airway narrowing and airway hyperresponsiveness in disease. *Eur Respir J* 2000;16:349-54.
17. SEPAR. Normativa para la espirometría forzada. Vol. 1. Barcelona: Doyma, 1985.
18. Siafakas NM, Vermeire P, Pride NB, Paoletti P, Gibson J, Howard P, et al. Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1995;8:S77-121.
19. Thompson AB, Huerta G, Robbins RA, Sisson JH, Spurzem JR, Van Essen S, et al. The bronchitis index: a semiquantitative visual scale for the assessment of airways inflammation. *Chest* 1993; 103:1482-8.
20. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
21. Martin JG, Duguet A, Eidelman DH. The contribution of airway smooth muscle to airway narrowing and airway hyperresponsiveness in disease. *Eur Respir J* 2000;16:349-54.
22. Colby TV, Yousem SA. Lungs. En: Sternberg SS, editor. *Histology for pathologists*. New York: Raven Press, 1992; p. 479-97.
23. Gartner LP, Hiatt JL. Muscle. En: Gartner LP, Hiatt JL, editors. *Color textbook of histology*, London: WB Saunders Co., 2001; p. 155-82.
24. Orozco-Levi M, Gea J, Lloreta JL, Félez M, Minguella J, Serrano S, et al. Subcellular adaptation of the human diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999;13:371-7.
25. Wong JZ, Woodcock-Mitchell J, Mitchell J, Rippetoe P, White S, Absher M, et al. Smooth muscle actin and myosin expression in cultured airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998;274:786-92.
26. Hirst SJ. Airway smooth muscle cell culture: application to studies of airway wall remodelling and phenotype plasticity in asthma. *Eur Respir J* 1996;9:908-18.
27. Saetta M, Finkelstein R, Cosio MG. Morphological and cellular basis for airflow limitation in smokers. *Eur Respir J* 1994;7:1505-15.
28. Hirst SJ, Walker TR, Chilvers ER. Phenotypic diversity and molecular mechanisms of airway smooth muscle proliferation in asthma. *Eur Respir J* 2000;16:159-77.
29. Mullen JB, Wright JL, Wiggs BR, Pare PD, Hogg JC. Reassessment of inflammation of airways in chronic bronchitis. *BMJ* 1985; 291:1235-9.