

# Relajantes musculares en el estudio morfométrico de los músculos respiratorios en seres humanos

M.C. Aguar, J. Gea, M. Orozco-Levi, J. Corominas\*, M. Pastó y J.M. Broquetas

Servicios de Neumología y \*Anatomía Patológica. Hospital del Mar. Unitat de Recerca de Pneumologia, IMIM. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona.

La evaluación morfológica de los músculos respiratorios puede verse alterada por la contracción muscular posterior a la toma de biopsias. No obstante, la mayoría de trabajos de morfometría de los músculos respiratorios se han realizado sin tener en cuenta este factor. La utilización de sustancias relajantes durante el procesamiento de las muestras puede disminuir este artefacto. El objetivo fue evaluar los cambios inducidos por una sustancia relajante en el análisis morfométrico de las fibras musculares. Método: Se evaluaron 31 muestras musculares procedentes de 7 pacientes. Inmediatamente después de su extracción, cada pieza fue dividida en dos porciones. Una fue transportada en una solución fisiológica isotónica, y la otra en una solución de *curare* al 0,02%. Posteriormente, ambas muestras fueron procesadas para el estudio morfométrico mediante tinción de ATPasa, NADTH y PAS. El análisis morfológico de los diferentes tipos de fibras incluyó la valoración del diámetro mínimo ( $D_{\min}$ ), índices de atrofia (IA) e hipertrofia (IH) y la heterogeneidad de la distribución ( $SD_{D_{\min}}$ ). Resultados: El  $D_{\min}$  de las fibras transportadas en solución de *curare* fue menor que el de las transportadas en solución fisiológica ( $67 \pm 2 \mu\text{m}$  frente a  $71 \pm 2 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,05$ ). Lo mismo sucedió con la  $SD_{D_{\min}}$  ( $13 \pm 3$  frente a  $12 \pm 3$ ,  $p < 0,05$ ) y el IH ( $300 \pm 88$  frente a  $457 \pm 107$ ,  $p < 0,05$ ). Asimismo, se observó una correlación directa entre el tamaño de las fibras procesadas con solución fisiológica y el de las procesadas con solución de *curare* ( $D_{\min}$ ,  $r = 0,731$ ,  $p < 0,001$ ; IH,  $r = 0,827$ ,  $p < 0,001$ ;  $SD_{D_{\min}}$ ,  $r = 0,636$ ,  $p < 0,0001$ ). Conclusión: La utilización de sustancias relajantes en el procesamiento de muestras musculares consigue evitar el artefacto de contracción y debiera utilizarse sistemáticamente en el análisis morfológico de las fibras musculares. Dado que los valores de referencia han sido obtenidos fundamentalmente de cadáveres, los trabajos *in vivo* deben tener en cuenta este factor.

**Palabras clave:** Músculos respiratorios. Relajantes musculares.

*Arch Bronconeumol* 1995; 31: 389-392

## Muscle relaxants in the morphometric study of human respiratory muscle

The morphological examination of respiratory muscle can be affected by muscular contraction following biopsy. Most morphometric studies of respiratory muscles, however, have been carried out without taking into account this factor, the effect of which can be reduced by using relaxants when taking samples. Objective. To examine the effect of using a relaxant in the morphometric analysis of muscle fibers.

We examined 31 muscle samples from 7 patients. Immediately after removal, each piece was divided in half. One was placed in an isotonic physiological solution and the other in a solution of *curare* 0.02%. Later, both samples were processed for morphometric study with ATP-ase, NADTH and PAS tincture. Morphological data recorded for the different types of fibers included measurement of minimum diameter ( $D_{\min}$ ), atrophy and hypertrophy indices (AI and HI) and heterogeneity of distribution ( $SD_{D_{\min}}$ ).

The  $D_{\min}$  was smaller in fibers transported in a *curare* solution than in those transported in physiological solution ( $67 \pm 2 \mu\text{m}$  vs.  $71 \pm 2 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.05$ ). The same was true of  $SD_{D_{\min}}$  ( $13 \pm 3$  vs.  $12 \pm 3$ ,  $p < 0.05$ ), HI ( $300 \pm 88$  vs.  $457 \pm 107$ ,  $p < 0.05$ ). Likewise, we found a similar direct correlation between size of fibers processed with physiological solution and those processed in *curare* ( $D_{\min}$ ,  $r = 0.731$ ,  $p < 0.001$ ; HI,  $r = 0.827$ ,  $p < 0.001$ ;  $SD_{D_{\min}}$ ,  $r = 0.636$ ,  $p < 0.0001$ ).

The use of relaxants in processing muscle samples prevents contraction and should be used systematically in the morphological analysis of muscle fibers. Given that reference values have been obtained mainly from cadavers, *in vivo* studies should be performed with this difference in mind.

**Key words:** Respiratory muscles. Myorelaxants.

## Introducción

En los últimos años, se ha destacado el papel de los músculos respiratorios en el desarrollo de insuficiencia ventilatoria<sup>1-3</sup>. Así, se han realizado numerosos

Correspondencia: Dra. M. Carmen Aguar. Servei de Pneumologia. Hospital del Mar. Passeig Marítim, 27. 08003 Barcelona.

Recibido: 5-12-94; aceptado para su publicación: 25-4-95.

estudios que han intentado evaluar la función de estos músculos, y su eventual relación con la estructura fibrilar. Generalmente, las muestras para el estudio morfológico se han obtenido de autopsias<sup>4,5</sup> o de pacientes sometidos a toracotomía<sup>6-9</sup>. En el primero de los casos son evidentes las interferencias que pueden crear los fenómenos que rodean a la muerte celular. Por otra parte, la evaluación morfológica de los músculos respiratorios obtenidos in vivo puede verse alterada por la contracción muscular posterior a la toma de biopsias. Sorprendentemente, la mayoría de autores ha obviado este problema<sup>7,8</sup>. En algunos casos han utilizado medios físicos (estiramiento y fijación tras extracción) para minimizar la contracción<sup>6,9,10</sup>. La utilización de sustancias relajantes durante el procesamiento de las muestras podría disminuir el artefacto de contracción. Algunos autores han utilizado la solución de Krebs con este propósito en modelos animales<sup>11,12</sup>. Sin embargo, no se conoce la verdadera relevancia del posible artefacto de contracción, y no se han utilizado sustancias relajantes en el procesamiento de muestras musculares respiratorias procedentes de pacientes. El objetivo de este trabajo es doble, evaluar la cuantía de dicho artefacto, y validar la utilización de una solución de curarina en el análisis morfométrico de estos músculos.

## Método

### Población y material

Se evaluaron un total de 31 grupos de fibras, correspondientes a 14 muestras de músculo, obtenidas de 7 pacientes tributarios de toracotomía por la existencia de una neoplasia pulmonar en estadio I ( $54 \pm 3$  años,  $FEV_1 58 \pm 19\%$  ref), procedentes de un estudio más amplio de morfometría en los músculos respiratorios y función pulmonar. Como músculos respiratorios se escogieron el diafragma e intercostales externos, y también se procesó el músculo control, en este caso el cuádriceps. Previamente a su inclusión en el estudio se obtuvo un consentimiento firmado de cada uno de los pacientes.

### Método

Las muestras respiratorias fueron obtenidas durante la toracotomía realizada en relación a la patología neoplásica de los pacientes. Inmediatamente después de su extracción, cada pieza de biopsia fue dividida en dos porciones. Una de ellas fue procesada mediante la técnica habitual. Es decir, transportada tras la fijación de sus extremos mediante sutura e inmersión en una solución fisiológica isotónica. La otra fue colocada en una gasa empapada con una solución de curare al 0,02% (154 mM/l). Esta dilución permite el bloqueo de los receptores muscarínicos<sup>13</sup>. El resto del procesamiento fue idéntico para las dos muestras. Es decir, con posterioridad ambas fueron fijadas en isopentano enfriado sobre N<sub>2</sub> líquido. Más tarde se procedió a la tinción con ATPasa (a diferentes niveles de pH: 9,4, 4,6 y 4,2), NADTH y PAS. Para el análisis morfológico de los diferentes tipos de fibras (I, II y IIa) se utilizó la medición del diámetro mínimo ( $D_{MIN}$ ), la valoración de los índices de atrofia (IA) e hipertrofia (IH) y el grado de heterogeneidad de la distribución ( $SD_{D_{min}}$ ). El diámetro mínimo fue escogido por ser el que

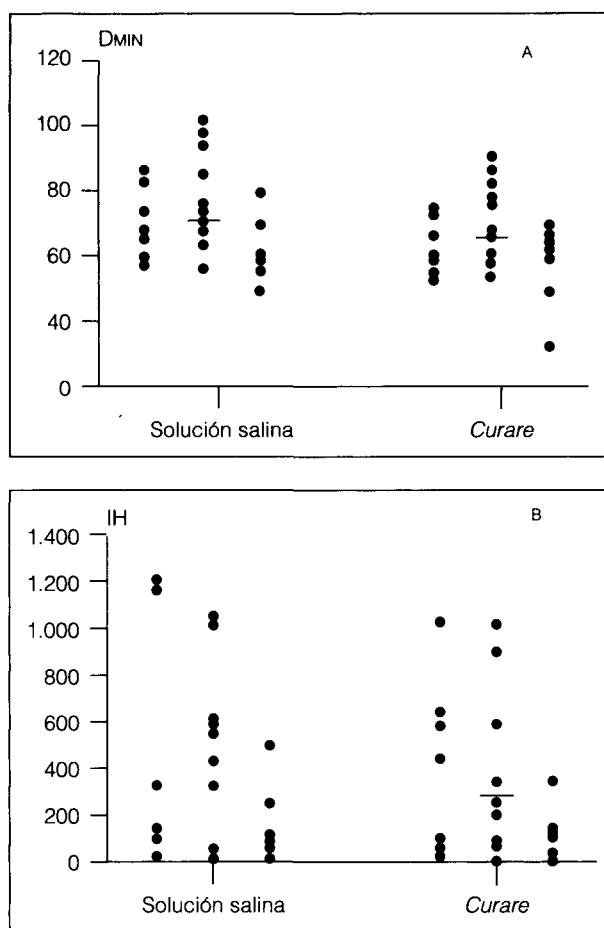


Fig. 1. Expresión de las diferencias entre el diámetro mínimo ( $D_{min}$ ) (a) y el índice de hipertrofia (b) de las fibras procesadas utilizando solución salina y solución con curare al 0,02%. Los valores individuales aparecen representados como puntos y el valor medio como una línea. La columna de la izquierda refleja los valores obtenidos mediante el procesamiento con solución salina. La columna de la derecha representa los valores obtenidos mediante el procesamiento con solución de curare.

menos se afecta por el ángulo del corte. Los índices de atrofia e hipertrofia confieren "pesos" sucesivos a aquellas fibras que se encuentran en los extremos de la distribución y más allá de los límites considerados normales<sup>14</sup>.

### Análisis estadístico

Para la estadística descriptiva se ha utilizado la media y desviación estándar de ésta. Para probar la normalidad de la distribución en cada variable se ha usado la prueba de Kolmogorov-Smirnoff. En caso de tratarse de variables con distribución normal, las comparaciones se realizaron mediante el test de t para datos apareados. La prueba de Wilcoxon se utilizó para el mismo propósito en variables sin distribución normal. Se consideró significativa una  $p < 0,05$ .

## Resultados

Todas las muestras musculares se encontraban constituidas por los dos tipos clásicos de fibras, dispuestas en el típico patrón en "mosaico". Es decir, no

existían agrupaciones fibrilares anómalas. La distribución de porcentajes para cada fibra fue similar en las muestras procesadas con y sin *curare* (sin *curare*, tipo I,  $51 \pm 5\%$  y tipo II,  $49 \pm 5\%$ ; con *curare*, tipo I  $51 \pm 2\%$  y tipo II  $49 \pm 2\%$ ).

El  $D_{MIN}$  de las fibras transportadas en solución fisiológica consideradas globalmente fue de  $71 \pm 2 \mu m$ , mientras que el de las transportadas en solución de *curare* fue significativamente menor ( $67 \pm 2 \mu m$ ,  $p < 0,05$ ) (fig. 1a). Las fibras transportadas en solución de *curare* también presentaban un IH menor ( $300 \pm 88$  frente a  $457 \pm 107$ ,  $p < 0,05$ ) (fig. 1b), aproximándose a los valores de normalidad (250-300). La desviación estándar ( $DE_{D_{min}}$ ) de la distribución correspondiente a cada grupo de fibras, que expresa la heterogeneidad en su tamaño, también disminuyó con el procesamiento con *curare* ( $13 \pm 3$  frente a  $12 \pm 3$ ,  $p < 0,05$ ). Sin embargo, el análisis del IA (cuya distribución no era normal) no demostró cambios significativos, a pesar de la notable diferencia entre sus medias ( $53 \pm 15$  frente a  $102 \pm 49$ ,  $p = 0,5$ ).

Por otra parte, tanto el  $D_{MIN}$  como el IH y el  $SD_{D_{min}}$  de las fibras procesadas en solución salina mostraron una buena correlación con los mismos parámetros obtenidos tras el procesamiento con *curare* ( $D_{MIN}$ ,  $r = 0,731$ ,  $p < 0,001$ ; IH,  $r = 0,827$ ,  $p < 0,001$ ;  $DE_{D_{min}}$ ,  $r = 0,636$ ,  $p < 0,0001$ ) (fig. 2). El IA no mostró correlación.

### Discusión

El hallazgo más relevante de este trabajo es la obtención de diferencias importantes en lo que respecta al tamaño de las fibras musculares respiratorias, según el procesamiento incluya o no una solución con propiedades relajantes. En concreto, el diámetro de las fibras es menor cuando se evita el artefacto de contracción. Además, la diferencia también afecta al extremo de la distribución (IH) y, ligeramente, a su grado de heterogeneidad ( $DE_{D_{min}}$ ). El primero de estos fenómenos, probablemente pueda explicarse por el hecho de que la contracción muscular determina un acortamiento de las fibras, que a su vez provoca un aumento del diámetro de las mismas. Las diferencias en el IH probablemente se expliquen de un modo similar. Este último hallazgo es especialmente importante, ya que en trabajos precedentes se ha relacionado la hipertrofia muscular con el deterioro de la función respiratoria. A tenor de los resultados del presente estudio, estos resultados podrían ser discutidos. En efecto, los valores obtenidos con *curare* y en pacientes con EPOC, se acercan a la normalidad. La menor dispersión de la muestra de fibras cuando se utiliza *curare* probablemente se deba a que se consigue una relajación homogénea. Cuando no se usa el relajante, cabe pensar que el artefacto de contracción afecta en grado diverso a las diferentes fibras.

La ausencia de cambio en cuanto al IA podría explicarse por la amplia dispersión de valores en esta variable. Además, se recomienda desechar para el análisis morfométrico aquellas fibras tan pequeñas que han

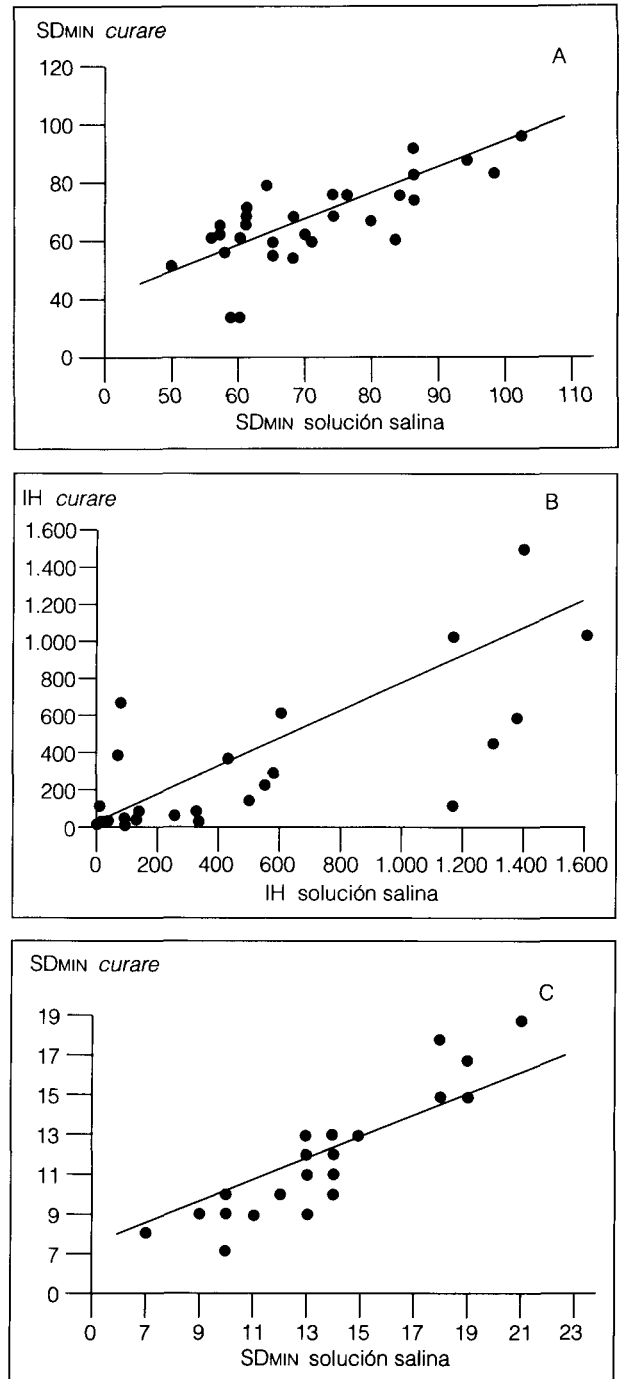
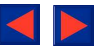


Fig. 2. Expresión de la correlación existente entre los parámetros obtenidos de las fibras procesadas con solución salina y las procesadas en solución de *curare* al 0,02%: a)  $D_{min}$ ,  $r = 0,731$ ,  $p < 0,001$ ; b) IH,  $r = 0,827$ ,  $p < 0,001$ , c)  $DE_{D_{min}}$ ,  $r = 0,636$ ,  $p < 0,0001$ .

perdido su aspecto poligonal. Esta premisa, que es útil habitualmente, también puede haber influido en los resultados.

Un punto a tener en cuenta es que la muestra no debe ser sumergida totalmente en la solución de *curare*, ya que esto determina la inhibición de las fibras,



con distorsión de su morfología por la presencia de cristales durante el proceso de congelación. Por el contrario, la muestra debe ser colocada en una gasa empapada con dicha solución.

En resumen, la utilización de sustancias relajantes a bajas concentraciones, como medio de transporte de las fibras musculares, consigue evitar el artefacto de contracción y debiera utilizarse sistemáticamente para el análisis morfométrico.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Roussos Ch, Macklem P.T. Diaphragmatic fatigue in man. *J Appl Physiol Respir Environ Exercise Physiol* 1977; 43: 189-197.
2. Bellemare F, Grassino A. Force reserve of the diaphragm in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Appl Physiol: Respir Environ Exercise Physiol* 1983; 55: 8-15.
3. Grassino A, Clanton T. Respiratory muscle fatigue. *Sem Resp Med* 1991; 12: 305-321.
4. Mizuno M, Secher N. Histochemical characteristics of human expiratory and inspiratory intercostal muscles. *J Appl Physiol* 1989; 67: 592-594.
5. Mizuno M. Human respiratory muscles: fibre morphology and capillary supply. *Eur Respir J* 1991; 4: 587-601.
6. Hards JM, Reid WD, Pardy RL, Paré PD. Respiratory muscles morphometry: correlation with pulmonary function and nutrition. *Chest* 1990; 97: 1.037-1.044.
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 Physiopath Resp* 1982; 18: 901-904.
8. 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.
9. Sauleda J, Gea J, Corominas J, Aran X, Minguella J, Orozco-Levi M, Broquetas JM. Fiber morphometry and respiratory function in human diaphragm. *Eur Respir J* 1992; 5: 421.
10. Farkas GA, Roussos Ch. Diaphragm in emphysematous hamsters: sarcomere adaptability. *J Appl Physiol: Respir Environ Exercise Physiol* 1983; 54: 1.635-1.640.
11. Salmons SD, Gale DR, Sreter FA. Ultrastructural aspects of the transformation of muscle fiber type by long term stimulation: changes in Z discs and mitochondria. *J Anat* 1978; 127: 17-31.
12. Stern LZ, Payne C, Gruener R, Anderson RM, Hannapel LK. Intercostal muscle biopsy in human neuromuscular disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 1975; 38: 900-910.
13. Wong LA, Gallagher JP. Pharmacology of nicotinic receptor-mediated inhibition in rat dorsolateral septal neurones. *J Physiol* 1991; 436: 325-346.
14. Brooke MH, Engel WK. The histographic analysis of human muscles biopsies with regard to fiber types. Adult male and female. *Neurology* 1969; 19: 221-233.